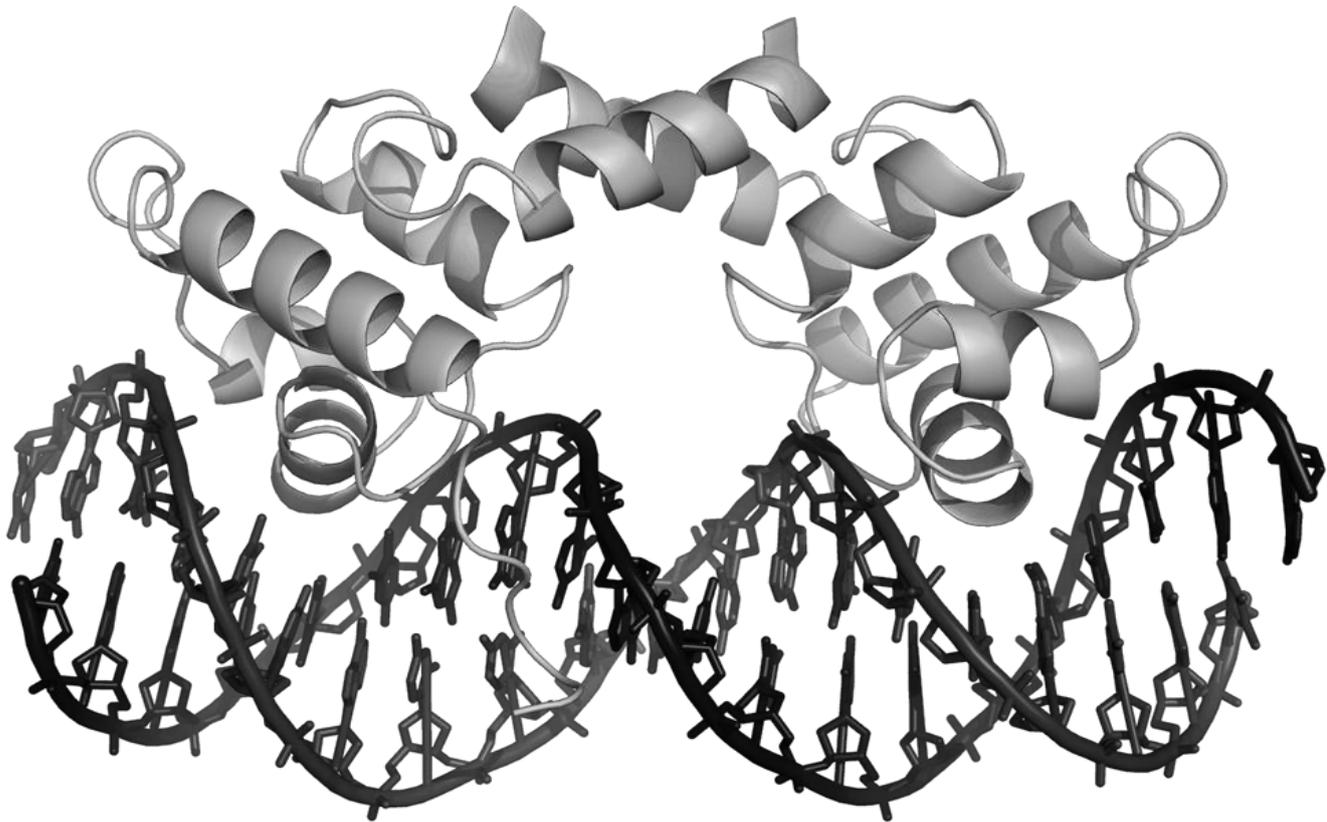


Aulas Práticas de Biologia Molecular



Protocolos traduzidos e adaptados de:

BLOOM, M. V., FREYER, G. A. & MICKLOS, D. A.

LABORATORY DNA SCIENCE: An introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc, 1996.

2017

Objetivos gerais do curso prático

- Adquirir habilidades para a execução dos métodos mais básicos e importantes da Biologia Molecular.
- Propor experimentos para testar hipóteses.
- Explicar como a metodologia pode ser utilizada para a obtenção de resultados.
- Interpretar resultados experimentais em termos de características físico-químicas de moléculas de ácidos nucleicos.
- Conhecer como modelos teóricos de fenômenos moleculares são construídos a partir de resultados experimentais.

Estratégias

Os experimentos serão realizados em grupos de no máximo três alunos, garantindo assim que todos tenham uma participação ativa nos diferentes protocolos.

- O aluno deverá ler previamente os textos referentes às unidades indicadas em aula anterior, anotando todas as dúvidas surgidas com a leitura. Isto permitirá ao aluno informar-se sobre conceitos elementares e preparar-se para entender o planejamento dos experimentos e para a análise dos resultados.
- Os resultados obtidos serão discutidos em conjunto com toda a turma.
- O aluno, juntamente com a ajuda de colegas, monitor e/ou professores deverá resolver os exercícios presentes no final de cada unidade.

Mesmo para estudantes motivados, a Biologia Molecular dá a impressão de ser extremamente abstrata. Fazer experimentos talvez seja a única maneira de reduzir essa abstração; por meio deles é possível conhecer as moléculas. Para compreender os métodos de inferência em genética molecular é necessário entender e saber interpretar bandas em géis, colônias em placas e sinais em membranas. Apenas quando esses métodos forem utilizados para a obtenção de resultados previsíveis, se começará a acreditar que os experimentos, de fato, constituem-se numa janela por onde se vê o mundo molecular.

Sumário

UNIDADE 1 – MEDIDAS E MICROPIPETAGEM	2
UNIDADE 2 – EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	6
UNIDADE 3 – EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	8
UNIDADE 4 – ELETROFORESE	11
UNIDADE 5 – DIGESTÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	19
UNIDADE 6 – MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO	23
UNIDADE 7 – MÉTODO RÁPIDO DE TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> COM DNA PLASMIDIAL	25
UNIDADE 8 – A TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	30
UNIDADE 9 – A TÉCNICA DO “SOUTHERN BLOTTING”	36
UNIDADE 10 – TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE	46
APÊNDICE I – TÉCNICAS DE CULTURA BACTERIANA	62
APÊNDICE II – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES	67

UNIDADE 1

MEDIDAS E MICROPIPETAGEM

Objetivo específico:

- Utilizar corretamente micropipetadores.

Esta aula de laboratório introduz os princípios básicos de micropipetagem utilizados muitas vezes no decorrer desse curso. Dominar estas técnicas é muito importante para se obter bons resultados em todos os experimentos. A maior parte das aulas seguintes vai se

basear em protocolos que usam volumes muito pequenos de DNA e de reagentes. Isto requer o uso de micropipetadores reguláveis capazes de medir volumes como o de 1 μl , ou seja, um milionésimo de um litro.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

CONVERSÕES MÉTRICAS: É importante neste momento nos familiarizarmos com certas unidades de medidas e suas conversões. Nós vamos nos concentrar principalmente nas medidas de volume, baseadas no litro, mas os mesmos prefixos são sempre válidos para medidas de massa baseadas no grama. As unidades de medidas de líquidos mais utilizadas na biologia molecular são o mililitro (ml) e o microlitro (μl)

$$\begin{array}{ll} 1 \text{ ml} = 0,001 \text{ l} & 1.000 \text{ ml} = 1 \text{ l} \\ 1 \text{ ml} = 1.000 \mu\text{l} & 1.000.000 \mu\text{l} = 1 \text{ l} \\ 1 \mu\text{l} = 0,000001 \text{ l} & \end{array}$$

MICROPIPETADORES: Um micropipetador é essencialmente uma bomba de precisão à qual se ajusta uma ponteira descartável. O volume de ar a ser aspirado é ajustado girando-se o calibrador de volume do pistão até o volume desejado.

Apertando-se o êmbolo, o volume especificado de ar é removido do pistão; quando se libera o êmbolo, cria-se um vácuo que aspira igual volume de líquido para dentro da ponteira. O líquido aspirado pode ser então expelido apertando-se o êmbolo novamente.

A amplitude de volumes medidos pelos

micropipetadores varia entre os modelos e os fabricantes. Micropipetadores de volumes menores (1-10 μl = P10; 2-20 μl = P20) e de volumes maiores (20-200 μl = P200; 100-1000 μl = P1000) são muito utilizados em laboratório. Os seguintes cuidados devem ser tomados ao manusear um micropipetador:

- Nunca gire o calibrador de volume acima dos limites superiores e inferiores de volume do micropipetador.
- Nunca mergulhe o pipetador num líquido sem a ponteira, pois isso prejudica o pistão.
- Nunca inverta ou deite o micropipetador com líquido na ponteira, pois o líquido pode ir para dentro do pistão.
- Nunca solte o êmbolo rapidamente após expelir o fluido, pois isto danifica o pistão.
- Nunca flambe a ponteira do micropipetador.
- Nunca reutilize uma ponteira que já foi utilizada para pipetar um reagente diferente.
- Evite mergulhar completamente a ponteira no líquido a ser pipetado; apenas toque a ponta da ponteira na superfície do líquido. Se ao pipetar você molhar toda a ponteira, certamente carregará um volume de solução maior do que o desejado.

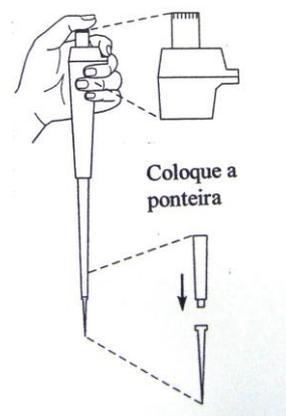
MATERIAL

- 1 ml de solução I, colorida
- 1 ml de solução II, colorida
- 1 ml de solução III, colorida
- 1 ml de solução IV, colorida
- micropipetador P1000 e ponteiros azuis
- micropipetadores P20 e P200 e ponteiros amarelos
- micropipetador P10 e ponteiros brancas
- microtubos de 1,5 ml
- recipiente para descarte das ponteiros usadas
- microcentrífuga
- caneta marcadora

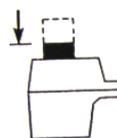
PROCEDIMENTO A: USO GERAL DE MICROPIPETADORES (10 min)

1. Gire o calibrador de volume para os vários volumes diferentes. Observe a diferença na altura no êmbolo à medida que o volume vai sendo modificado no P20. Verifique também se ajustou corretamente o volume na casa decimal.
2. Coloque no micropipetador uma ponteira de tamanho adequado.
3. Quando estiver aspirando o líquido, segure sempre o tubo entre os dedos. Mantenha o tubo na altura dos olhos para observar a mudança do nível do líquido na ponteira. Não pipete com os tubos apoiados na estante.
4. Cada tubo deve ser mantido nas mãos durante cada manipulação. De preferência, abra o tubo de microcentrífuga com o polegar da outra mão, vagarosamente, para não espirrar o conteúdo ao abrir. Durante a manipulação, segure o tubo pelo corpo e não pela boca para evitar contaminações.
5. Para pipetar, coloque o micropipetador na palma da mão e envolva-o com os dedos. Movimente o êmbolo com o polegar e mantenha o micropipetador quase vertical enquanto estiver aspirando o líquido.
6. Quando o líquido está sendo expelido, a maioria dos micropipetadores tem dois pontos de 'parada'. O primeiro expelle o volume exato de líquido que estava na ponteira. O segundo injeta uma quantidade adicional de ar que ajuda a expelir completamente qualquer resto da solução que fica na ponteira. Você pode sentir estes dois pontos de parada com o polegar, pressionando o êmbolo.

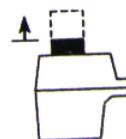
7. Para retirar uma amostra de um tubo contendo um reagente (figura):
 - a. Aperte o êmbolo até o primeiro ponto de parada e mantenha-o nesta posição. Mergulhe a ponteira na superfície e encha a ponteira, soltando o êmbolo vagarosamente. Verifique se a ponteira permanece na solução enquanto você está soltando o êmbolo, caso contrário bolhas de ar vão ser aspiradas junto com a solução.
 - b. Deslize a ponteira pela superfície interna do tubo para remover gotículas de solução que aderem à ponteira.
 - c. Verifique se não existe ar na extremidade da ponteira. Para evitar cometer erros no futuro, observe bem quais os níveis aproximados de líquido na ponteira para os volumes pipetados. Assim, qualquer grande discrepância você poderá reconhecer facilmente, se estiver pipetando errado.
 - d. Se você observar bolhas de ar na amostra na ponteira, devolva a amostra ao tubo. Elimine ar da amostra batendo o tubinho na bancada ou centrifugando-o rapidamente.

USO DO MICROPIPETADOR**Passo 7
Retirando a amostra**

Aperte o êmbolo até a primeira parada



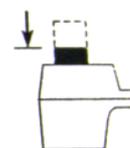
Solte o êmbolo



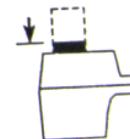
Aspire a amostra para dentro da ponteira

**Passo 8
Expelindo a amostra**

Aperte o êmbolo até a primeira parada



Aperte o êmbolo até a segunda parada

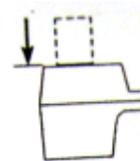


Aplique a gota na parede do tubo

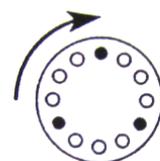
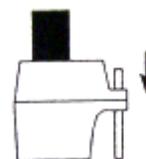


8. Para expelir uma amostra da ponteira:
 - a. Toque a ponta da ponteira na superfície interna do tubo para o qual a amostra vai ser transferida.
 - b. Expulse o líquido lentamente até atingir o primeiro ponto de parada. Aperte o êmbolo até o segundo ponto de parada para eliminar os últimos restos da amostra. Mantenha o êmbolo nesta posição.
 - c. Tire a ponteira do tubo com o êmbolo sempre pressionado, para evitar aspirar a amostra de volta para a ponteira.
 - d. Remova manualmente a ponteira ou ejetor-a, descartando-a num recipiente na bancada. A ponteira é ejetada pressionando-se um botão separado de ejeção.
9. Para evitar contaminação de reagentes:
 - a. Sempre adicione a quantidade adequada de um único reagente a todos os tubos de reação sequencialmente (assim você também economiza ponteiras).
 - b. Libere as gotas de reagentes diferentes em locais diferentes na parede interior do tubo de reação, assim você pode usar a mesma ponteira para aplicar a solução em vários tubos, sem contaminar um reagente com outro.
 - c. Use uma ponteira limpa cada vez que mudar o reagente que vai ser pipetado.
 - d. Se você desconfiar que a ponteira está contaminada com outro reagente, troque-a por outra limpa.

Ejetando a ponteira



Aperte o ejetor de ponteiras



PROCEDIMENTO B: USO DOS MICROPIPETADORES P10 e P20

Este exercício simula o preparo de uma reação, utilizando micropipetadores P10 e P20.

1. Use uma caneta marcadora para identificar 3 tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, chamando-os de A, B e C.
2. Utilize a tabela abaixo como lista de tarefas para adicionar as soluções a cada um dos tubos.

Tubo	Solução I	Solução II	Solução III	Solução IV (tampão azul)
A	11 μ l	1 μ l	-	8 μ l
B	15 μ l	-	1 μ l	4 μ l
C	13 μ l	1 μ l	2 μ l	4 μ l

3. Ajuste o micropipetador apropriado (P10 para volumes de até 10 μ l ou P20 para volumes entre 10 - 20 μ l) e adicione a solução I a cada tubo de reação como indicado na tabela.
4. Com o micropipetador apropriado adicione a solução II aos tubos A e C.
5. Troque a ponteira e adicione a solução III aos tubos. Repita agora para a solução IV.
6. Feche as tampas dos tubos, coloque os tubos na microcentrífuga e aplique um pulso curto de alguns segundos. Não se esqueça de colocar os tubos no rotor da centrífuga numa posição EQUILIBRADA. Girar os tubos em uma posição desequilibrada pode danificar seriamente a centrífuga.
7. Um total de 20 μ l de reagentes foi adicionado a cada tubo. Verifique a precisão de suas medidas, ajustando o micropipetador P20 para 20 μ l e retirando cuidadosamente solução de cada tubo. A ponteira ficou completamente cheia? Ficou líquido no tubo? Existe ar na extremidade da ponteira, após enchê-la com a solução? (O volume que faltou para encher a ponteira pode ser calculado rodando o calibrador de volume para expulsar todo o ar e trazer o líquido para a extremidade da ponteira).
8. Repita o exercício várias vezes até conseguir resultados praticamente perfeitos.

Um tubo de 1,5ml vazio pode ser usado para equilibrar uma amostra na centrífuga desde que a amostra tenha até 20 μ l.

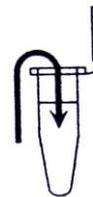


PROCEDIMENTO C: USO DOS MICROPIPETADORES (P200 e P1000)

Este exercício simula protocolos que serão realizados nas aulas práticas. É muito mais fácil fazer medidas erradas com um micropipetador de volumes maiores. Se o êmbolo não for liberado vagarosamente, podem se formar bolhas dentro da ponteira e a solução pode ser aspirada para dentro do pistão.

1. Utilize as canetas marcadoras para identificar 2 tubos de microcentrífuga, D e E.
2. Use a tabela abaixo como lista de tarefas para adicionar as soluções a cada um dos tubos.

Tubo	Solução I	Solução II	Solução III	Solução IV
D	100 μ l	200 μ l	150 μ l	550 μ l
E	150 μ l	250 μ l	350 μ l	250 μ l



3. Ajuste o micropipetador (P200 para volumes de até 200 μ l ou P1000 para volumes entre 200-1000 μ l) para adicionar aos tubos D e E, os volumes corretos das soluções.
4. Um total de 1000 μ l de reagentes foi adicionado a cada tubo. Para verificar suas medidas, ajuste o micropipetador para 1000 μ l e recupere o total de solução de cada tubo. A ponteira ficou completamente cheia? Ficou um pouco de solução no tubo? Existe ar na extremidade da ponteira? No último caso, ajuste o micropipetador até remover todo o ar para medir o volume que falta para encher a ponteira.
5. Se você obteve medidas imprecisas, repita o exercício até obter resultados praticamente perfeitos.

DISCUSSÃO

1. Por que os tubos precisam estar equilibrados no rotor da microcentrífuga?
2. Quais são os erros comuns de pipetagem que podem levar a uma subpipetagem ou uma superpipetagem?

UNIDADE 2

EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Objetivos específicos:

- Extrair DNA total de um organismo eucarioto.
- Conhecer os princípios básicos de um protocolo de extração de DNA total.
- Interpretar o padrão obtido após fracionamento, por eletroforese, do DNA total.

Os protocolos para extração de DNA, apesar de apresentarem pequenas diferenças dependendo do material biológico do qual ele será extraído, consistem basicamente de duas etapas. Na primeira etapa, provoca-se o rompimento das membranas celulares, o que permite a liberação do DNA. Os agentes mais comumente empregados para a lise das membranas são os detergentes. Na segunda etapa, realizam-se um ou mais tratamentos enzimáticos ou químicos para purificar a preparação de contaminantes como RNA, proteínas e outras macromoléculas.

A maior impureza em uma preparação de ácidos nucleicos é constituída por proteínas, principalmente as mais estreitamente associadas ao DNA, como as histonas dos eucariotos. Essas proteínas podem ser digeridas, por exemplo, com a enzima proteinase K. Porém, o agente desproteinizante mais largamente utilizado é o fenol, um eficiente desnaturador de proteínas. O clorofórmio é um outro desnaturante de proteínas bastante empregado; ele é comumente utilizado em combinação com o fenol uma

vez que atua como um estabilizador da junção entre as fases aquosa e fenólica. Desse modo, a utilização da mistura fenol/clorofórmio reduz a quantidade de solução aquosa retida na fase orgânica melhorando consideravelmente o rendimento da preparação. O álcool isoamílico é utilizado para evitar a formação de espuma na agitação da mistura durante o procedimento de extração das proteínas. Após tratamento com os agentes desproteinizantes, a mistura é centrifugada para separação das fases fenólica e aquosa. Na interface entre essas duas fases deposita-se uma camada de proteínas desnaturadas.

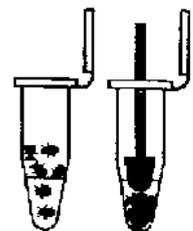
O DNA contido na fase aquosa é, então, precipitado com etanol. Na presença de concentrações relativamente altas de cátions monovalentes, o etanol induz uma mudança estrutural transitória nas moléculas dos ácidos nucleicos ocasionando sua agregação e precipitação. Os cátions utilizados na precipitação, assim como pequenas moléculas orgânicas ainda presentes na preparação, podem ser removidos por lavagem com etanol 70%.

MATERIAL

- 15 adultos de *Drosophila melanogaster* congelados
- bastão plástico
- etanol 100% e 70%
- solução estoque de proteinase K (10 mg/ml)
- solução estoque de SDS 20%
- fenol/clorofórmio / álcool isoamílico 25:24:1
- tampão de homogeneização (TMD)
- TE
- banho-maria a 65°C
- microtubos de 1,5 ml
- microcentrífuga
- micropipetadores P10, P20, P200 e P1000
- caneta marcadora
- dessecador conectado à bomba de vácuo
- recipiente para descarte de ponteiros
- recipiente com gelo moído

PROCEDIMENTO A: EXTRAÇÃO DO DNA total (35 min.)

1. Utilize uma caneta marcadora para identificar o tubo de microcentrífuga contendo os adultos de *Drosophila* com a letra da turma e número de seu grupo.
2. Use o micropipetador P1000 para adicionar 300 µl de tampão de homogeneização (TMD) ao tubo de microcentrífuga contendo drosófilas.
3. Use um bastão plástico que adapta-se ao fundo de um tubo de microcentrífuga para homogeneizar gentilmente as moscas (5 movimentos são suficientes).
4. Use o micropipetador P20 para acrescentar 12 µl de uma solução de SDS 20%; a concentração final de SDS no homogenado será de 0,8%.
5. Use o micropipetador P10 para acrescentar 3 µl de uma solução estoque de proteinase K (10 mg/ml). Misture invertendo o tubo. Com esse procedimento o homogenado terá concentração final de 100 µg/ml.
6. Incube a preparação durante 20 minutos a 65°C.



As etapas 7 e 8 serão realizadas na capela pelos monitores.

7. Use o micropipetador P1000 para acrescentar 300 μ l de fenol/clorofórmio (todo o volume do tubo). Feche a tampa do tubo e agite gentilmente, por inversão do tubo, durante 3 minutos.
8. Centrifugue os tubos durante 5 minutos. Lembre-se de colocar os tubos no rotor da centrífuga em uma configuração equilibrada.
9. Na capela, use o micropipetador P200 para transferir 300 μ l do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga. Não esqueça de identificá-lo. Cuidado para não coletar material da interfase ou do fenol/clorofórmio.
10. Leve o tubo com o sobrenadante para sua bancada. Use o micropipetador P1000 para acrescentar 600 μ l de etanol 100% (dois volumes), feche o tubo e inverta-o gentilmente para misturar os componentes. Nesse passo, o DNA é precipitado e pode ser visualizado.
11. Centrifugue durante 5 minutos para coletar o DNA precipitado no fundo do tubo.
12. Descarte o sobrenadante invertendo o tubo; use o recipiente de descarte de ponteiros como depósito. Após a drenagem do sobrenadante, segure o tubo na posição invertida até que a última gota tenha saído.
13. Use o micropipetador P1000 para acrescentar 200 μ l de etanol 70% ao tubo contendo o DNA precipitado. Esse passo corresponde à lavagem da preparação para retirada de restos de sal.
14. Centrifugue durante 5 minutos. Descarte o etanol 70% invertendo o tubo; use o recipiente de descarte de ponteiros como depósito. Após a drenagem do sobrenadante, segure o tubo na posição invertida até que a última gota tenha saído.

PONTO DE PARADA: *As etapas a seguir serão realizadas pelo monitor.*

15. Coloque o tubo contendo o DNA no dessecador e ligue a bomba de vácuo durante 2 minutos.
16. Use uma ponteira nova para acrescentar 40 μ l de TE. Misture bem. Se necessário, armazene a 4°C.

BIÓLOGO DE COZINHA (Receita caseira para isolar DNA de uma banana)

1. Descasque uma banana grande e pique-a em pequenos pedaços.
2. Em um outro recipiente, misture 150 ml de água, uma colher de sopa de detergente e uma colher de chá de sal de cozinha. Mexa bem.
3. Junte a banana picada a essa solução. Misture bem.
4. Coloque em banho-maria a 65°C por 30 minutos (esse passo não é essencial).
5. Coe a mistura em uma peneira e coloque o líquido resultante em um copo ou outro recipiente transparente.
6. Despeje delicadamente dois volumes de álcool comum; o DNA começa a ser precipitado na interfase.

PERGUNTA PARA DISCUSSÃO

1. Considerando os procedimentos de extração do DNA total você espera obtê-lo sem quebras mecânicas e/ou químicas?

UNIDADE 3

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Objetivos específicos:

- Extrair DNA plasmidial.
- Conhecer os princípios básicos da técnica de extração de DNA plasmidial.
- Reconhecer, em gel de agarose, as diferentes formas topológicas apresentadas por um plasmídeo.
- Identificar o plasmídeo através da digestão de seu DNA e fracionamento em gel de agarose.

O DNA plasmidial consiste de uma molécula circular dupla fita, existente naturalmente em bactérias, e que se auto replica independentemente do genoma da célula. Uma das características importantes desse DNA é conter genes que conferem à célula que o abriga resistência a antibióticos ou que codifiquem algum nutriente para o qual a célula é deficiente. Existe uma infinidade de plasmídeos e muitos foram geneticamente modificados em laboratório para o uso em clonagem molecular. Maiores detalhes sobre essas moléculas, como conteúdo e organização, serão discutidos nas aulas teóricas.

Nesse protocolo, utilizaremos células de *E. coli* contendo um plasmídeo que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Mais de 100 cópias do plasmídeo

estão presentes por célula de *E. coli*. As células serão coletadas a partir de uma colônia resistente à ampicilina e crescidas até a fase estacionária em meio líquido (ver Apêndice I). Esse procedimento tem por objetivo aumentar o número de células que pode ser obtido a partir de uma colônia. As células contidas em 1,5 ml da cultura serão coletadas e lisadas, e o DNA plasmidial será separado das proteínas e lipídeos celulares e do DNA cromossômico. Este procedimento fornece de 2 a 5 µg de DNA plasmidial em contraste com preparações em grande escala, que fornecem 1 mg ou mais de plasmídeo puro a partir de 1 litro de cultura.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

As minipreparações de DNA são geralmente realizadas a partir de colônias de bactérias que foram obtidas em manipulações recentes, ou seja, no máximo há cerca de uma semana. Não há necessidade de material estéril para a realização deste protocolo.

A minipreparação é um procedimento simples e eficiente para o isolamento de DNA plasmidial. Você deve se familiarizar com os efeitos bioquímicos e moleculares de cada reagente utilizado no protocolo:

- **Glicose/Tris/EDTA:** a glicose funciona para manter a pressão osmótica, enquanto que o Tris tampona as células em um pH 8.0. O EDTA liga-se a cátions divalentes da bicamada lipídica, fragilizando deste modo o envelope celular. Após a lise celular, o EDTA evita a degradação do DNA, ligando-se a íons Mg^{++} , que são cofatores necessários para a ação das nucleases bacterianas.
- **SDS/hidróxido de sódio:** esta mistura alcalina lisa as células bacterianas. O detergente SDS dissolve os componentes lipídicos do envelope celular. O hidróxido de sódio degrada a parede celular e desnatura os DNAs plasmidial e cromossômico em cadeias simples; os círculos intactos do DNA plasmidial permanecem concatenados.
- **Acetato de potássio/ácido acético:** o ácido acético neutraliza o pH, permitindo que as cadeias do DNA renaturem. Pedacos grandes de cadeias cromossômicas rompidas não voltam a hibridar perfeitamente, colapsando em um entrelaçado parcialmente hibridado. Ao mesmo tempo, o acetato de potássio precipita o SDS da suspensão celular, juntamente com os lipídeos e proteínas associados.

O DNA cromossômico parcialmente renaturado fica preso ao precipitado SDS/lipídeo/proteína. Apenas os DNAs plasmidiais menores, fragmentos do DNA cromossômico e moléculas de RNA escapam ao precipitado e permanecem em solução.

- **Isopropanol:** o álcool rapidamente precipita os ácidos nucleicos, enquanto as proteínas precipitam mais lentamente. Portanto, uma precipitação rápida leva para baixo preferencialmente os ácidos nucleicos.
- **Etanol 70%:** a água presente no etanol 70% remove alguns sais e o SDS remanescentes da preparação.
- **Tris/EDTA:** o Tris tampona a solução de EDTA. O EDTA protege o DNA da degradação por DNases, ligando-se aos cátions divalentes (especialmente Mg^{++}), que são cofatores necessários para a atividade da DNase.
- **DETALHES DA TÉCNICA:** Tenha cuidado para não agitar em excesso a preparação; a manipulação excessiva provoca a fragmentação tanto do DNA cromossômico quanto do plasmidial. O sucesso deste protocolo depende muito da preservação do DNA cromossômico em pedaços grandes, que possam ser diferencialmente separados do DNA plasmidial intacto. A fragmentação mecânica diminui o rendimento de DNA plasmidial superenrolado, de alta qualidade, e aumenta a contaminação com pequenas sequências de DNA cromossômico. Certifique-se de que a microcentrífuga estará imediatamente disponível após a precipitação com isopropanol (passo 12). Se você estiver compartilhando a microcentrífuga, combine com os outros colegas para iniciar os passos 14 e 15 juntos.

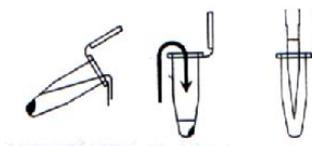
MATERIAL

- cultura líquida de *E. coli* com plasmídeo
- glicose/Tris/EDTA(GTE)
- SDS/hidróxido de sódio (SDS/NaOH)
- acetato de potássio/ácido acético (KOAc)
- isopropanol
- etanol 70%
- Tris/EDTA(TE)
- microcentrífuga
- toalhas de papel
- micropipetadores P200 e P1000 + ponteiros
- microtubos de 1,5 ml
- recipiente com gelo moído
- recipiente para descarte das ponteiros utilizadas
- solução desinfetante (Lysoform)
- banho seco
- caneta marcadora
- suporte para tubos de ensaio

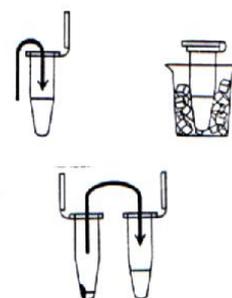
PROCEDIMENTO A: ISOLAMENTO DO DNA PLASMIDIAL (50 min)

Cada grupo fará uma preparação.

1. Bata com os dedos nas laterais do tubo de cultura para ressuspender as células de *E. coli*.
2. Marque um tubo de microcentrífuga com a letra da turma e número do grupo.
3. Transfira 1.500 μl da suspensão *E. coli* para o tubo.
4. Feche a tampa e coloque o tubo em uma configuração *equilibrada* no rotor da microcentrífuga. Centrifugue por 15 segundos para precipitar as células.
5. Descarte o sobrenadante em um Erlenmeyer de descarte para posterior autoclavagem. *Tome cuidado para não ressuspender os precipitados de células.* Inverta o tubo e toque sua borda com uma toalha de papel limpa, para secar o melhor possível os restos do sobrenadante.
6. Adicione ao tubo 100 μl da solução GTE gelada. Ressuspensa o precipitado pipetando a solução várias vezes. Olhe o tubo contra a luz para verificar se a suspensão está homogênea, ou seja, se não há grumos de células visíveis.
7. Adicione ao tubo 200 μl da solução de SDS/NaOH à temperatura ambiente. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo cerca de 5 vezes.
8. Coloque o tubo no gelo por 5 minutos. A suspensão vai se tornar relativamente transparente.
9. Adicione ao tubo 150 μl da solução de acetato de potássio/ácido acético (KOAc) gelada. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo por 5 vezes. Um precipitado branco aparecerá imediatamente.
10. Coloque o tubo no gelo por 5 minutos.
11. Coloque o tubo em uma configuração *equilibrada* no rotor da microcentrífuga e centrifugue por 5 minutos para obter um precipitado.
12. Transfira 400 μl do sobrenadante para um tubo limpo de 1,5 ml. *Evite pipetar o precipitado.* Retire qualquer precipitado que tenha ficado aderido à parede externa da ponteira antes de transferir o sobrenadante. Descarte o tubo usado contendo o precipitado.
13. Adicione ao tubo contendo o sobrenadante, 400 μl de isopropanol. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo por 5 vezes. *Deixe o tubo à temperatura ambiente por apenas dois minutos.*
14. Coloque o tubo em uma configuração *equilibrada* no rotor da microcentrífuga e centrifugue por 5 minutos para precipitar os ácidos nucleicos. Alinhe o tubo no rotor de modo que a alça da tampa fique voltada para fora. O resíduo de ácido nucleico, visível ou não, ficará no fundo do tubo sob a alça, durante a centrifugação.
15. Descarte o sobrenadante do tubo. *Tome cuidado para não ressuspender o precipitado de ácidos nucleicos.* Retire o máximo possível do álcool remanescente com uma toalha de papel.
16. Adicione ao tubo 200 μl de etanol 70% e feche a tampa. Bata com os dedos na lateral do tubo por várias vezes para lavar os precipitados.
17. Coloque o tubo em uma configuração *equilibrada* no rotor da microcentrífuga e centrifugue por 2-3 minutos para coletar de novo o precipitado de ácidos nucleicos.
18. Descarte o sobrenadante do tubo. *Tome cuidado para não ressuspender o precipitado.* Retire o máximo possível do álcool remanescente



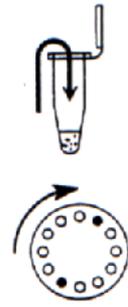
A pipetagem precisa é essencial para um bom rendimento na extração de plasmídeos. Os volumes dos reagentes são precisamente calibrados de tal modo que o hidróxido de sódio adicionado é neutralizado por ácido acético. Não misture demais. O excesso de agitação fragmenta o DNA e diminui o rendimento de extração de DNA de plasmídeo.



O precipitado se forma caracteristicamente ao longo do tubo ao invés de formar no fundo do mesmo. Faça o passo 14 rapidamente e certifique-se de que a microcentrífuga esteja disponível para o passo 15. O isopropanol precipita preferencialmente ácidos nucleicos rapidamente, no entanto proteínas e outros componentes celulares que ainda permanecem na solução começarão a precipitar também.

com uma toalha de papel e deixe o tubo virado sobre o papel na bancada. *As demais etapas serão feitas pelo monitor.*

19. Assegure-se de que o precipitado de ácidos nucléicos está seco e que todo o etanol evaporou, antes de prosseguir com o passo 21. Segure o tubo contra a luz e confirme que não restam gotas de etanol, e que o precipitado de ácidos nucléicos, se visível, aparece como um floco esbranquiçado. Cheire a boca do tubo, se o etanol ainda estiver evaporando, um cheiro de álcool será detectado.
20. Adicione 40 μ l de TE a cada tubo. Ressuspenda o precipitado pipetando várias vezes a solução. Lave as paredes do tubo várias vezes, principalmente na área em que o precipitado deve ter-se formado durante a centrifugação (abaixo da alça da tampa). Certifique-se de que todo o DNA está dissolvido e de que não restam partículas na ponteira ou na parede do tubo.
21. Faça uma limpeza em sua bancada:
 - a. Coloque os tubos de cultura, tolhas de papel e ponteiras que tenham entrado em contato com *E. coli* no recipiente designado para descarte.
 - b. Limpe a bancada com álcool.
 - c. Lave as mãos antes de deixar o laboratório.



O precipitado aparecerá no fundo de cada. No entanto o tamanho do precipitado não serve como referência para a qualidade e quantidade de plasmídeo extraído. Precipitados grandes podem ser compostos por RNA, sal e restos celulares originados do precipitado inicial; precipitados pequenos, ou aqueles impossíveis de serem vistos, normalmente indicam uma preparação pura.

Os precipitados de ácidos nucléicos são insolúveis em etanol e não se ressuspendem durante a lavagem.

PERGUNTAS PARA DISCUSSÃO

1. Considere as três principais classes de moléculas biologicamente importantes: proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Que passos da minipreparação agem sobre as proteínas? E sobre os lipídeos? E sobre os ácidos nucléicos?
2. Que características da estrutura do DNA plasmidial permitem que ele renature eficientemente no passo 10?
3. Que outros tipos de moléculas, além do DNA plasmidial, você esperaria estarem presentes na amostra final da minipreparação? Como você poderia descobrir isso?
4. Explique por que o EDTA é um componente importante do tampão TE no qual o DNA da minipreparação é dissolvido.

UNIDADE 4

ELETROFORESE

Objetivos específicos:

- Confeccionar géis de agarose.
- Entender os princípios básicos do método de eletroforese.
- Fracionar por eletroforese os produtos de uma digestão de DNA.

Eletroforese é um termo geral que se refere à técnica de separação ou caracterização de moléculas carregadas eletricamente com base em suas taxas específicas de migração em um campo elétrico. O processo é geralmente realizado em uma matriz porosa de modo que as macromoléculas possam migrar diferencialmente de acordo com suas propriedades físicas.

A matriz usada comumente na separação de moléculas de DNA com tamanhos variando entre 100 e 30.000 pares de bases é o gel de agarose, uma forma de ágar altamente purificada. A matriz porosa do gel de agarose serve como uma peneira molecular através da qual as moléculas movem-se com velocidades diferentes, inversamente proporcionais ao seu tamanho. Assim, quanto menor for a molécula, maior será a distância que ela percorre em um determinado período de tempo.

Os fragmentos de DNA migram em direção ao pólo positivo, uma vez que têm carga elétrica negativa, conferida pela ionização dos seus grupos fosfato. Após a migração eletroforética, todas as moléculas de DNA de mesmo tamanho ficam agrupadas em uma determinada região do gel e são visualizadas como uma **banda**.

Podemos dividir o procedimento de eletroforese em quatro etapas: preparação do gel de agarose, aplicação das amostras, eletroforese e análise dos fragmentos separados.

A concentração de agarose no preparo do gel é escolhida em função do tamanho dos fragmentos que se deseja separar. Uma certa quantidade de agarose é colocada em um volume adequado de solução tampão, geralmente o TBE, de modo a se obter a concentração desejada. A mistura é aquecida para derreter a agarose e em seguida é despejada em uma bandeja. Sobre a

solução ainda quente na bandeja coloca-se um pente de plástico que forma cavidades ou poços no gel quando a agarose se solidifica. Ao esfriar, a agarose constituirá um gel solidificado, formado por uma densa rede de moléculas interligadas, e o pente é cuidadosamente removido do gel, deixando uma série de poços para a aplicação das amostras.

O gel é imerso, então, em uma cuba contendo o tampão de corrida da eletroforese. O tampão de eletroforese mais utilizado é o TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Este tampão pode ser reutilizado várias vezes em eletroforese. Você pode armazenar o tampão já usado em um recipiente ou então na própria cuba de eletroforese se ela tiver uma tampa que evite a evaporação. Antes da aplicação, as amostras de DNA são misturadas a uma solução densa, contendo sacarose ou glicerol (tampão de aplicação de eletroforese), a qual contém também um ou dois corantes que auxiliam a monitorar o deslocamento das moléculas no gel.

As amostras de DNA são então aplicadas e a cuba contendo o gel submerso em solução tampão é conectada a uma fonte de corrente contínua. A corrente elétrica gerada pela fonte se transmite através da solução tampão e faz com que as moléculas migrem em direção ao pólo positivo, saindo do poço e penetrando no gel.

Após algum tempo, quando os corantes atingem uma distância adequada dos poços, a corrente é desligada e o gel é transferido para uma solução contendo o corante brometo de etídeo. Alternativamente, este corante pode ser adicionado ao gel antes dele se solidificar ou também ao tampão de corrida.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

A eletroforese em gel de agarose, combinada com a coloração pelo brometo de etídeo, permite uma análise rápida de fragmentos de DNA. Antes da introdução desse método em 1973, a análise de DNA era muito mais trabalhosa. O método original de separação de moléculas de DNA era a ultracentrifugação em gradiente de sacarose, o que fornecia estimativas aproximadas do tamanho das moléculas e requeria mais de 24 horas para ser executada.

A eletroforese em géis de acrilamida montados em tubos de vidro representou uma certa melhoria nos procedimentos, mas podia ser usada apenas na separação de moléculas de DNA de até 2000 pares de base. Outro inconveniente era que o DNA precisava ser marcado radioativamente para ser analisado por esse método.

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida era cortado em fatias e a quantidade de radiação em cada fatia era medida. A quantidade de radiação era lançada em gráfico em relação à distância migrada, produzindo uma série de picos radioativos representando os fragmentos de DNA.

Por convenção, os géis são interpretados da esquerda para a direita, com os poços sempre orientados para cima. A área da coluna formada desde o poço de aplicação, por onde migrou o DNA aplicado é chamada de raia.

A MIGRAÇÃO DO DNA EM GEL DE AGAROSE: A taxa de migração do DNA em um gel de agarose depende de quatro fatores principais: da concentração de agarose no gel, da corrente aplicada, da configuração das moléculas de DNA e do tamanho do DNA fragmentado.

As moléculas de DNA migram na matriz de agarose com taxas diferentes, que são inversamente proporcionais ao \log_{10} do seu peso molecular. Assim, o peso molecular de um fragmento de interesse pode ser determinado comparando-se sua mobilidade com a mobilidade de moléculas padrão, com pesos moleculares conhecidos.

A concentração da agarose tem um papel importante nas separações eletroforéticas, uma vez que ela determina o tamanho dos poros da matriz e, consequentemente, a amplitude dos tamanhos de fragmentos que podem ser separados nesse processo.

A migração de moléculas de DNA no gel de agarose depende da voltagem aplicada. A voltagem aplicada a um gel gera um campo elétrico com uma força que é definida pelo comprimento do gel e pela diferença de potencial entre as suas extremidades (V/cm). A velocidade de migração do DNA é proporcional à voltagem. Quanto maior a voltagem, maior a velocidade de migração. Porém, em voltagens muito altas as moléculas maiores migram com uma velocidade proporcionalmente maior do que as menores. Além disso, altas voltagens causam mais imperfeições no gel, como diferenças na intensidade e espessura das bandas nas diferentes regiões do gel. Defeitos comuns são bandas inclinadas ou em forma de "U". A inclinação das bandas costuma ocorrer nas regiões mais próximas às bordas. O gel liquefeito com altas temperaturas adere às bordas, tornando-as mais espessas que o centro. Essas diferenças causam defeitos na migração. Por essa razão, voltagens superiores a 5 V/cm não devem ser utilizadas em sistemas de eletroforese.

Moléculas de DNA com mesmo peso molecular, mas com configurações espaciais diferentes, migram com velocidades diferentes em um gel. Assim, moléculas circulares superenroladas (forma I), moléculas circulares mas relaxadas por causa de cortes em uma cadeia (forma II) e moléculas lineares (forma III) apresentam migração diferencial. Na ausência de brometo de etídeo, as moléculas superenroladas migram mais rapidamente que moléculas lineares do mesmo tamanho. Moléculas de DNA com corte em uma das cadeias, logo, relaxadas, migram mais lentamente que as moléculas lineares ou superenroladas de mesmo peso molecular.

MONITORAMENTO DA ELETROFORESE: O primeiro sinal de que a corrente elétrica realmente está passando pela cuba é a visualização dos produtos da eletrólise da água, ou seja, bolhas de hidrogênio se formam no eletrodo negativo e o gás oxigênio surge a partir do eletrodo positivo. Minutos depois, é possível verificar que os corantes do tampão de aplicação já estão migrando através do gel, em direção ao pólo positivo. A banda que se move mais rapidamente é a do corante azul de bromofenol, de cor mais azulada; a banda que se move mais devagar é a do xileno-cianol (mais esverdeada). O azul de bromofenol migra através de um gel de agarose a 0,8% do mesmo modo que um fragmento de DNA de aproximadamente 500 pb. O xileno cianol migra o equivalente a um fragmento de DNA de 5000 pares de bases.

A COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDEO E CUIDADOS NO MANUSEIO: A coloração com brometo de etídeo é o método mais rápido, prático, sensível e reproduzível de se corar DNA em géis de agarose. Esse corante se intercala entre as bases adjacentes dos ácidos nucléicos e fluoresce em laranja (590 nm) quando iluminado por luz ultravioleta (260 a 360 nm). Porém, como muitas das substâncias usadas em laboratório, o brometo de etídeo é um mutagênico potente e, portanto, um sério candidato a composto carcinogênico. Os protocolos desse curso que manipulam o brometo de etídeo serão realizados preferencialmente pelos professores, em

áreas especialmente reservadas para estes procedimentos. O brometo de etídeo pode ser adicionado ao próprio gel quando este está esfriando, pode ser adicionado ao tampão de eletroforese TBE durante a eletroforese, ou o gel pode ser corado com brometo após a eletroforese, em um recipiente separado. Por causa da contaminação que poderia vir a ocorrer nos dois primeiros métodos, para efeito de aulas práticas, é mais conveniente fazer a coloração do gel após a eletroforese. Assim, o tampão de corrida, as cubas e as bancadas de laboratórios ficarão livres de contaminação.

Com cuidado, a solução diluída (1 $\mu\text{g/ml}$) usada para corar os géis oferece poucos riscos. O maior risco seria inalar o pó do brometo de etídeo quando se prepara as soluções. Existem laboratórios que comercializam soluções já preparadas do brometo de etídeo, para minimizar os riscos.

MANUSEIO E DESCONTAMINAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDEO

1. Sempre use luvas descartáveis quando for trabalhar com soluções de brometo de etídeo ou com géis já corados.
2. Limite o uso do brometo de etídeo a uma região do laboratório reservada especialmente para esse fim.
3. Após a coloração de um gel, use um funil para jogar a solução do brometo de etídeo em um recipiente especial para descarte.
4. Géis já corados e soluções usadas devem ser tratadas de acordo com protocolos especiais de descontaminação.

VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS CORADOS: A visualização dos géis de agarose depende da transiluminação com luz ultravioleta, que faz o brometo de etídeo fluorescer. Uma luz ultravioleta de comprimento de onda entre 260-360 nm emite luz na amplitude ótima para iluminar os géis corados com brometo de etídeo.

CUIDADO: *a luz ultravioleta é prejudicial à retina. Nunca olhe diretamente para uma lâmpada de ultravioleta sem proteção para os olhos. Observe os géis sempre usando máscaras ou óculos que absorvem os comprimentos de onda prejudiciais.*

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA DOS GÉIS: As fotografias obtidas a partir dos géis de agarose são muito importantes como registro dos experimentos realizados e indispensáveis para a interpretação posterior dos mesmos. Às vezes, fotografias com longo tempo de exposição conseguem registrar sinais muito fracos ou invisíveis ao olho humano.

Uma câmera é utilizada para fotografar os géis colocados sobre um transiluminador de ultravioleta. Uma capela de plástico, conectada na frente da câmera fotográfica forma uma mini-câmara escura, além de colocar as lentes a uma distância apropriada para o foco do gel.

IMPORTÂNCIA DA INTEGRIDADE DOS POÇOS NOS GÉIS DE AGAROSE: Quaisquer defeitos causados na forma dos poços de aplicação dos géis de agarose, durante a modelagem do gel ou durante a aplicação das amostras, podem ser causa importante de problemas na eletroforese (Veja Figura no final dessa Unidade). Para que haja a formação de bandas de DNA bem definidas após a migração é necessário que as moléculas de DNA de mesmo tamanho entrem no gel exatamente ao mesmo tempo. Qualquer fator que deforme a face interna anterior do poço e que tire esta face da posição de per-

pendicularidade em relação ao campo elétrico vai alterar o aspecto das bandas de DNA formadas. A lista abaixo explica as principais fontes de danos causados aos poços de aplicação e que causam deformações nas bandas de DNA:

1. Inserir a ponta da ponteira diretamente dentro do poço pode causar deformações nas paredes dos poços, além do risco de se perfurar o fundo do poço. Nesse caso, quando a amostra é aplicada, ela vaza completamente para o tampão, atravessando o fundo do gel. Os géis devem estar sempre submersos em tampão no momento da aplicação das amostras. Centralize a extremidade da ponteira no poço e abaixe a ponteira até ela tocar a superfície do tampão. Então, lentamente, expulse a amostra da ponteira. Como o tampão de aplicação das amostras contém sacarose ou glicerol em sua composição, estas subs-

tâncias aumentam a densidade da amostra e fazem com que ela afunde rapidamente no poço.

2. Entortar ou balançar o pente na hora de sua remoção pode deformar os poços. Segure firmemente o pente com as duas mãos na hora de retirá-lo e faça um movimento coordenado das duas mãos.
3. Remover os pentes antes que a agarose tenha endurecido completamente também deforma os poços. Não tenha pressa ao confeccionar um gel: é muito difícil distinguir visualmente um gel quase solidificado de um já bem solidificado.
4. Sujeira ou resíduos de agarose em um pente mal lavado também alteram a forma dos poços. Inspeção cada pente antes de usar e lave-os bem para remover qualquer resíduo de agarose. Pentes tortos tiram os poços da posição perpendicular.

MATERIAL

- água destilada
- tampão de aplicação de eletroforese
- agarose a 0,8%
- tampão TBE 1x
- brometo de etídeo 1 µg/ml
- papel alumínio
- Erlenmeyer para agarose e água
- recipiente para ponteiras usadas
- câmera fotográfica
- fita adesiva
- microcentrífuga
- cuba de eletroforese
- caneta marcadora
- fonte de eletroforese
- placa protetora contra U.V.
- estante para tubos de microcentrífuga
- transiluminador de luz ultravioleta
- banho-maria a 60°C (para agarose)

PROCEDIMENTO A: PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE A 0,8% (10 min)

1. Sele as bordas da bandeja com fita adesiva e posicione o pente. Coloque a bandeja sobre uma bancada de laboratório plana, de modo que a agarose se distribua uniformemente na bandeja quando for derramada. Algumas cubas de eletroforese possuem nível para ajuste de inclinação.
2. Pese a agarose necessária para fazer um gel a 0,8% (por exemplo, para fazer um gel de 100 ml, pese 0,8 g de agarose). Dissolva a agarose no volume desejado de TBE 1x. Derreta a agarose em banho-maria ou em microondas, até a fervura. Após a fervura, complete com água até o volume correto do gel que deseja preparar, pois parte da água se evapora na fervura. Espere esfriar um pouco, derrame a solução de agarose sobre a bandeja, preenchendo-a até uma altura de cerca de 5 mm. O gel deve recobrir cerca de 1/3 da altura dos dentes do pente. Use uma ponteira de micropipetador para remover eventuais bolhas que se formam na superfície do gel, enquanto o gel ainda está líquido.
3. O gel vai ficando mais turvo à medida que se solidifica (o processo leva cerca de 10 minutos). Tome muito cuidado para não mover a bandeja antes que o gel esteja perfeitamente solidificado. Para testar se já está firme, toque o gel em um dos seus cantos, bem longe da região dos pentes.
4. Quando a agarose estiver pronta, remova as fitas adesivas da bandeja. Coloque a bandeja dentro da cuba de eletroforese, de modo que os poços fiquem mais próximos do pólo negativo (eletrodo preto).
5. Encha a cuba de eletroforese com o tampão TBE 1x até o tampão cobrir 1 mm acima da superfície do gel.
6. Remova o pente cuidadosamente, puxando-o de maneira rápida e firme. Não desloque ou balance o pente quando estiver tirando, para não deformar os pocinhos.
7. A remoção dos pentes costuma levantar a agarose nas bordas dos poços fazendo saliências na superfície do tampão. Acrescente mais um pouco de tampão até cobrir as saliências e tornar a superfície do tampão homogênea. Em alguns tipos de equipamentos, o gel é derramado diretamente sobre a bandeja instalada dentro da cuba de eletroforese.

Excesso de tampão no tanque de eletroforese canaliza a corrente preferencialmente para cima do gel e não através dele. Isto aumenta o tempo de eletroforese necessário para separar os fragmentos de DNA. O TBE pode ser utilizado várias vezes em eletroforese. Se você for utilizar em um experimento o TBE já usado em uma corrida prévia, balance a cuba para misturar o tampão, redistribuindo os íons que se acumulam próximos às extremidades da cuba.

Alguns equipamentos de eletroforese requerem que você remova o pente antes de colocar a bandeja na cuba com tampão. Nesse caso, é conveniente molhar a superfície do gel na hora de remover o pente, para não deformar os pocinhos.

PONTO DE PARADA: *Um gel pode permanecer nessa situação até por vários dias, desde que fique completamente submerso em tampão.*

PROCEDIMENTO B: APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS de DNA E ELETROFORESE (10 min, seguidos de uma hora de eletroforese)

OBS. *essa etapa será realizada pelos professores. Os alunos, nessa aula prática, aplicarão no gel somente o tampão de coloração para treinamento.*

1. Descongele as extrações. Transfira 8 μ l de DNA plasmidial e 4 μ l de DNA de *Drosófila* para microtubos novos e identifique-os.
2. Adicione o tampão de aplicação a cada uma das amostras da seguinte maneira: adicione 2 μ l do tampão de aplicação a cada um dos microtubos; tampe-os e bata o fundo dos mesmos na bancada para descer o tampão. Você também pode submeter os tubos a uma centrifugação rápida para abaixar o tampão.
3. Utilize o micropipetador para aplicar as amostras em poços separados do gel. Use sempre uma ponteira limpa para cada aplicação.
 - a. Segure o micropipetador bem firme com as duas mãos sobre o poço do gel.
 - b. Se houver ar na extremidade da ponteira, antes de aplicar a amostra, aperte o êmbolo para empurrar a amostra para a extremidade da ponteira.
 - c. Centralize a ponteira sobre o poço, mergulhe a ponteira sobre o poço o suficiente para tocar a superfície do tampão e gentilmente aperte o êmbolo do micropipetador, expelindo a amostra.
 - d. Feche a tampa da cuba de eletroforese e conecte os eletrodos à fonte: ânodo com ânodo (vermelho com vermelho) e cátodo com cátodo (preto com preto).
 - e. Ligue a fonte de eletroforese e ajuste para 100-150 V. A fonte deve indicar uma amperagem ao redor de 50-200 miliampères. Se você não observar bolhas nos eletrodos, que indicam a passagem de corrente, verifique se os eletrodos estão corretamente conectados.
 - f. Deixe a eletroforese correr por 40-60 minutos. Uma boa separação deve ser conseguida quando o azul de bromofenol tiver se movido cerca de 4-7 cm a partir dos poços de aplicação. Pare a eletroforese antes que o azul de bromofenol saia do gel.
 - g. Desligue a fonte, desconecte os eletrodos e remova a tampa da cuba de eletroforese.
4. Remova com cuidado a bandeja da cuba e coloque o gel em um recipiente onde será realizada a coloração do gel com brometo de etídeo.

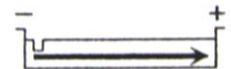
PONTO DE PARADA: *Nesse ponto o gel pode ser armazenado: cubra-o com um pequeno volume de tampão, para corá-lo e fotografá-lo no dia seguinte. Contudo, após alguns dias de armazenamento, o DNA vai se difundir através do gel e então não será possível visualizar bem as bandas.*

5. Core o gel com a solução de brometo de etídeo e observe o resultado, usando o método descrito a seguir.

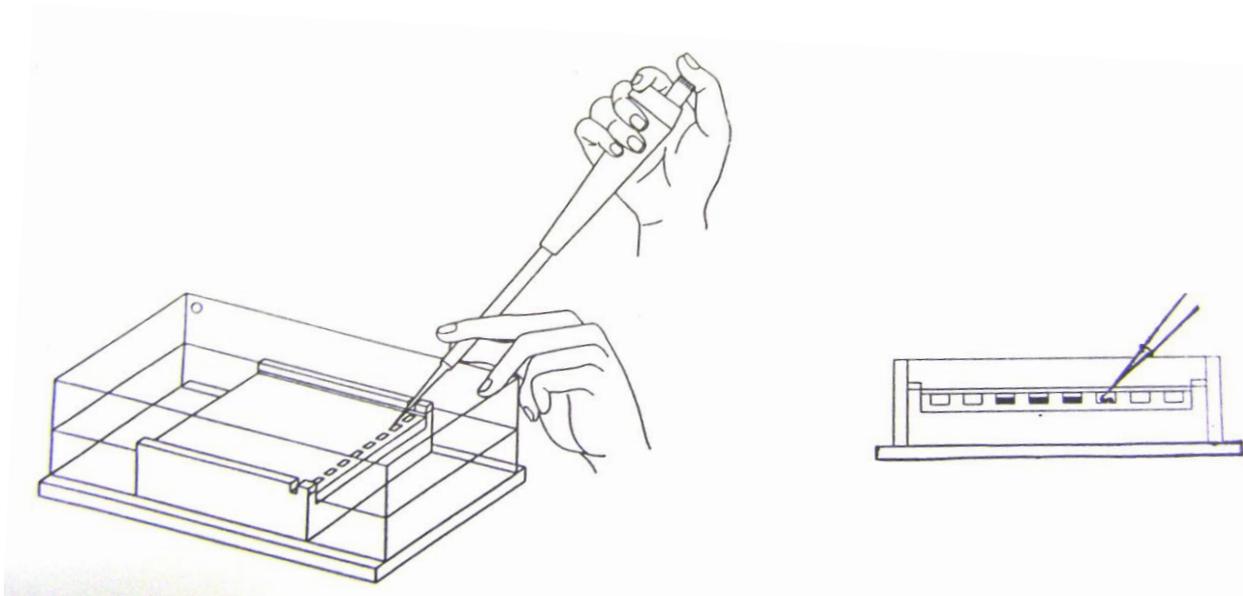
Na maior parte das cubas de eletroforese, existe uma placa com faixas vermelhas que, colocada sob o gel, ajuda a tornar os poços de aplicação mais visíveis. Se o aparato não tiver esse acessório, coloque um pedaço de papel escuro sob os poços e eles ficarão mais visíveis.

Cuidado para não inserir a ponteira diretamente dentro dos pocinhos; cuidado para não danificá-los.

O glicerol ou sacarose, presentes no tampão de aplicação, dão mais peso à amostra e fazem com que a mesma afunde rapidamente nos poços quando você a aplica na superfície.



Quando você corre dois géis acoplados a uma mesma fonte de eletroforese, a quantidade de corrente (amperagem) necessária para correr os géis a uma dada voltagem é o dobro da necessária para correr um único gel.



PROCEDIMENTO C: COLORAÇÃO DO GEL COM BROMETO DE ETÍDEO E VISUALIZAÇÃO DO DNA (5 min para coloração e 5 min para a visualização)

OBS. essa etapa será realizada pelos professores.

CUIDADO: *Reveja o item sobre a coloração com brometo de etídeo e manuseio. Use luvas de proteção no procedimento de coloração, visualização e fotografia do gel e limpeza das bancadas.*

1. Cubra o gel com uma solução de brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e deixe-o corando por 5-10 min.
2. Observe o gel sobre o transiluminador de luz ultravioleta.

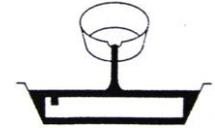
CUIDADO: *A luz ultravioleta é prejudicial à pele e principalmente aos olhos. Nunca olhe diretamente sem proteção para o transiluminador de U.V. Olhe o gel através de óculos de proteção ou de uma placa de vidro ou plástico.*

3. Não se esqueça de lavar as mãos antes de deixar o laboratório.

PROCEDIMENTO D: DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA (5 min)

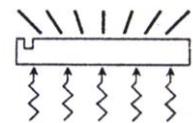
O tempo ideal de exposição de uma fotografia de gel depende de algumas variáveis como a massa de DNA nas raias, a intensidade da coloração, a espessura do gel e a densidade do filtro. Consulte o professor na hora da fotografia.

Para a fotografia de géis corados com brometo de etídeo é utilizada uma câmera digital.



Em géis mais espessos, o tempo de coloração com o brometo de etídeo deve ser aumentado. O "background" de brometo de etídeo não associado ao DNA também é maior em géis mais espessos.

A solução de brometo de etídeo para corar géis pode ser reutilizada cerca de quinze vezes. Quando o tempo de coloração ficar excessivamente longo, adicione mais brometo de etídeo fresco à solução ou substitua-a.



A intensidade das bandas e o contraste aumentam muito quando o gel é descorado em água de torneira por 15-30 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: ELETROFORESE

1. Quais são as duas funções do tampão de aplicação de eletroforese?
2. Como o brometo de etídeo cora o DNA? Porque é necessário reduzir ao máximo o contato humano com o brometo de etídeo?
3. O que aconteceria se:
 - A cuba de eletroforese contivesse água ao invés do TBE?
 - Fosse usada água ao invés do TBE no preparo do gel de agarose?
 - Os eletrodos fossem invertidos?
4. O que representa uma banda em um gel de agarose?

PARTE II: ANÁLISE DAS EXTRAÇÕES DE DNA TOTAL E PLASMIDIAL

1. Qual foto corresponde ao gel do DNA plasmidial e qual foto corresponde ao gel do DNA total de *Drosophila*? Justifique baseado no tamanho, forma e integridade desses DNAs.
2. O que representa um arrasto?
3. Qual a constituição de uma banda?
4. O que são as bandas da primeira coluna?
5. O que é essa nuvem no final do gel? Como testar?

A. INTERPRETAÇÃO DO GEL COM DNA PLASMIDIAL

Interpretar géis contendo DNA de plasmídeo não é um processo direto e ainda é complicado pelas impurezas da miniprep de DNA. As raia da miniprep podem ser distinguidas pelas seguintes características (observe também a raia 1 da foto do gel ideal):

- Quase toda a extensão da raia da miniprep será ocupada por um arrasto de fundo, formado por fragmentos de DNA cromossomal, DNA de plasmídeo, e RNA degradados e parcialmente digeridos. Esse arrasto é composto por bandas fracas, representando virtualmente todos os comprimentos em pares de bases. Um arrasto intenso, junto com o DNA de grande tamanho molecular, na parte superior da raia da amostra não digerida, indica que a miniprep está contaminada com grandes quantidades de DNA cromossomal.
- Material não dissolvido e DNA de grande tamanho molecular ficam frequentemente presos na entrada da fenda de aplicação da amostra. Essas imperfeições não ocorrem em preparações comerciais, nas quais o DNA plasmidial é separado dos ácidos nucléicos degradados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de célio.
- Uma “nuvem” de RNA de baixo peso molecular é frequentemente observada tanto nas raia de minipreps digeridas quanto nas de DNA não digerido, em uma posição correspondendo a 100-200 pb. Novamente, vários tamanhos de moléculas estão representados, os remanescentes de moléculas maiores parcialmente digeridas pela RNase. No entanto, a maioria do RNA por ser composta por fragmentos pequenos sai do gel durante a eletroforese ou não intercala o brometo de etídeo.



M: marcador λ / *Hind* III
 P1: plasmídeo grupos 1-5
 P2: plasmídeo grupos 6-10

É intrigante observar várias bandas de DNA em uma raia que sabidamente contém apenas plasmídeo não cortado. Isto ocorre porque a migração do DNA plasmidial, no gel de agarose, depende de sua conformação molecular e do seu tamanho molecular (em pares de bases). O DNA de plasmídeo pode existir em três conformações principais:

- *Forma I, superenrolada*: apesar do plasmídeo ser, em geral, representado como um círculo estendido no interior da célula de *E. coli* (*in vivo*) a cadeia de DNA é uma molécula *superenrolada*. A forma molecular compacta faz com que o plasmídeo superenrolado seja a forma de migração mais rápida em gel, na maior parte das condições de eletroforese utilizada rotineiramente nos laboratórios. Portanto, assume-se que a banda de migração mais rápida do plasmídeo não cortado corresponde à forma superenrolada.
- *Forma II, círculo cortado ou relaxado*: quebras físicas e cortes enzimáticos que ocorrem durante o isolamento do plasmídeo, introduzem quebras em uma das fitas do DNA superenrolado, originando a estrutura circular aberta. Portanto, a porcentagem de plasmídeo superenrolado é um indicador do cuidado com que o DNA foi extraído da célula de *E. coli*. O círculo relaxado é a forma do plasmídeo de migração mais lenta; sua forma molecular “frouxa” dificulta o movimento através da matriz de agarose.
- *Forma III, linear*: o DNA linear é produzido quando uma enzima de restrição corta o plasmídeo em um único sítio de reconhecimento, ou quando um dano resulta em quebras em cadeias diretamente opostas uma à outra, na hélice do DNA. Na maioria das condições de gel, o DNA plasmidial linear migra a uma taxa intermediária entre a forma superenrolada e a circular. A presença de DNA linear, em uma preparação de plasmídeo, é um sinal de contaminação por nucleases ou de algum procedimento inadequado (por exemplo, excesso de agitação ou quantidades erradas de SDS/NaOH e KOAc nos passos 8 e 10 do protocolo da miniprep).

A linhagem de *E. coli* utilizada é *recA+*, isto é, têm um sistema enzimático que promove a recombinação de plasmídeos, formando longos concatenados de duas ou mais unidades de plasmídeo. A recombinação homóloga, um mecanismo geral para o embaralhamento de cadeias de DNA, ocorre quando sequências iguais de nucleotídeos são trocadas entre duas moléculas de DNA. Em hospedeiros *recA+*, frequentemente ocorre recombinação homóloga entre cópias múltiplas e idênticas de um plasmídeo. A enzima *recA* liga-se a regiões de cadeia simples de plasmídeos com cortes em uma das fitas, promovendo troca e reunião de sequências homólogas. Isto resulta em plasmídeos multiméricos (“super”), que aparecem como uma série de bandas de migração lenta, próximas à parte superior do gel. Uma vez que o concatenado se forma (cabeça-cauda) ele dá origem a fragmentos de restrição idênticos aos de um monômero (plasmídeo único), quando cortado por uma determinada enzima de restrição. Para confundir um pouco mais, os multímeros podem existir em qualquer uma das formas descritas acima. Multímeros superenrolados podem aparecer, no gel, ainda abaixo dos monômeros lineares ou relaxados com menos pares de bases.

PARA DISCUSSÃO

1. Examine a fotografia do seu gel. Compare seu gel com o gel ideal mostrado na página anterior. Marque os tamanhos dos fragmentos em cada amostra do seu gel.
 2. Compare as amostras da miniprep de DNA plasmidial dos grupos 1 a 5 com a dos grupos 6 a 10. Explique as possíveis razões para variações.
 3. O que é possível concluir em relação à forma do DNA plasmidial?
-

B. INTERPRETAÇÃO DO GEL COM DNA TOTAL

A eletroforese em gel de agarose é comumente utilizada para verificar a qualidade e quantidade de DNA obtido em extrações. Muitas das observações feitas para o DNA plasmidial também são válidas para o total, como por exemplo: arrasto de fundo, DNA de alto peso molecular presente no poço e nuvem de RNA. No entanto, as interpretações diferem um pouco.

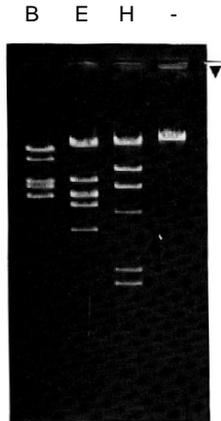
PARA DISCUSSÃO

1. É possível observar bandas bem definidas? Quantas?
 2. Qual a relação entre o número de bandas observado e o número de cromossomos de *Drosophila* (4)? Proponha uma explicação.
 3. Qual a relação existente entre a qualidade do DNA total extraído e o arrasto visualizado em gel?
-

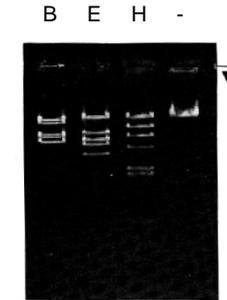
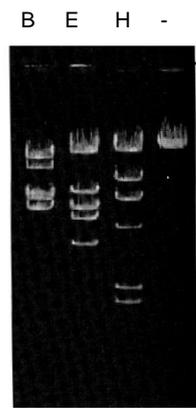
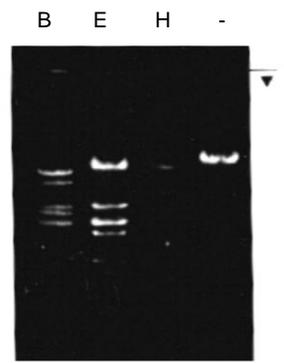
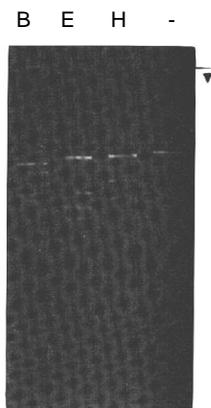
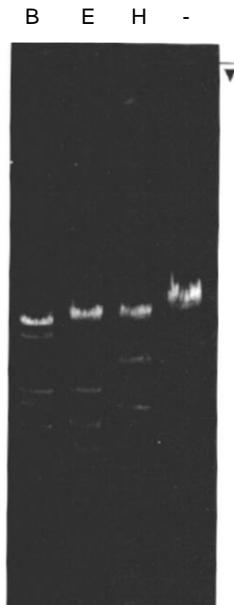
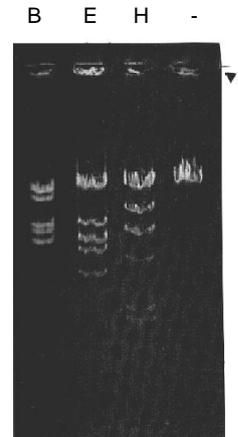
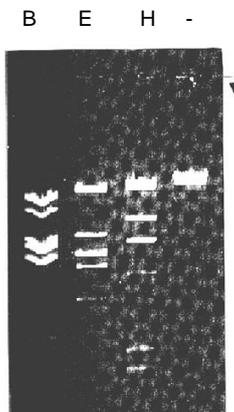
DISCUSSÃO GERAL E PLANEJAMENTO DO PRÓXIMO EXPERIMENTO

1. Como provar que o material extraído é realmente DNA? Poderia ser RNA? Poderia ser proteína?
2. Como determinar o tamanho real das moléculas de DNA plasmidial?
3. Como começar a conhecer um pouco mais sobre o genoma de *Drosophila*?

Exemplos de géis



Gel ideal

Tempo curto de corrida
Bandas mal separadas.Raias sobrecarregadas
Excesso de DNA nas digestões.Poços perfurados
Bandas fracas nas raias B e H. O DNA foi perdido através do fundo do poço.Pouco DNA aplicado
Bandas fracas em todas as raias, pouco DNA.Tempo longo de corrida
Bandas dispersas.Pocinhos deformados
Bandas borradas em todas as pistas. O pente foi removido antes que o gel solidificasse.Precipitado
Precipitado no TBE usado no preparo do gel.Bolha na raia
Distorção nas bandas da raia B é devida a presença de bolhas.Gel confeccionado com água
Bandas borradas em todas as raias. Gel foi feito com água ou com concentração errada de TBE.

UNIDADE 5

DIGESTÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Objetivos específicos:

- Identificar a natureza do material extraído nas UNIDADES 2 e 3 utilizando enzimas.
- Conhecer o modo de ação de uma enzima de restrição.
- Verificar se há RNA presente nas duas extrações.
- Visualizar, documentar e interpretar géis de agarose contendo fragmentos de DNA com diferentes tamanhos.

Existem várias enzimas que atuam sobre os ácidos nucléicos, algumas sem especificidade em relação às bases, como a DNase que degrada moléculas de DNA e a RNase que degrada moléculas de RNA. Dentre as enzimas que atuam de modo mais específico, daremos maior enfoque às enzimas de restrição.

A história das enzimas de restrição remonta ao início dos anos 50, quando foram encontradas evidências de que as bactérias possuíam uma espécie de sistema imune primitivo que as tornava resistentes à infecção por bacteriófagos. Em 1962, Werner Arber forneceu a primeira evidência de que as bactérias resistentes à infecção possuíam um sistema de enzimas que reconhecia e destruía seletivamente o DNA de fago quando este penetrava na célula. Descobriu-se também que este sistema de proteção bacteriano era capaz de modificar o DNA da bactéria de modo a impedir a sua destruição pelas enzimas de restrição produzidas pela própria bactéria.

As enzimas modificadoras protegem o DNA da bactéria adicionando grupos metil em nucleotídeos específicos da sequência reconhecida pela enzima de restrição. Essa modificação do DNA evita que ele seja reconhecido pela enzima de restrição e cortado.

Hoje são conhecidas perto de mil enzimas de restrição diferentes, obtidas das mais diversas espécies de bactérias. Essas enzimas diferem entre si quanto à

sequência de bases do DNA que reconhecem e cortam. As sequências de reconhecimento são em geral simétricas, isto é, a mesma sequência de 4 a 8 nucleotídeos quando lida na direção 5'-3', está presente em ambas as fitas do DNA, ocorrendo portanto em sentidos inversos na dupla hélice. As enzimas de restrição cortam o DNA sempre entre o mesmo par de nucleotídeos em ambas as fitas (Figura 1).

O resultado do corte de uma molécula de DNA por uma enzima de restrição pode gerar fragmentos com extremidades retas, como é o caso da enzima *Hpa I*; porém, a maioria das enzimas de restrição, ao cortar a dupla hélice, origina fragmentos com extremidades de fita simples complementares entre si. Essas extremidades são ditas **coesivas**, uma vez que cada extremidade de fita simples pode emparelhar com qualquer outra extremidade produzida pela mesma enzima (Figura 2).

As extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição permitem que dois fragmentos quaisquer possam ser facilmente ligados, desde que os fragmentos tenham sido originados pela mesma enzima de restrição.

Moléculas de DNA produzidas pela união de dois ou mais fragmentos de origens diversas são chamadas **moléculas de DNA recombinante**.

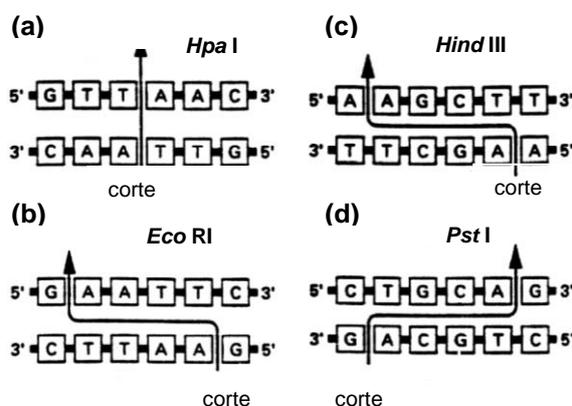


Figura 1. Sequências de nucleotídeos reconhecidas por quatro enzimas de restrição, mostrando as posições dos cortes.

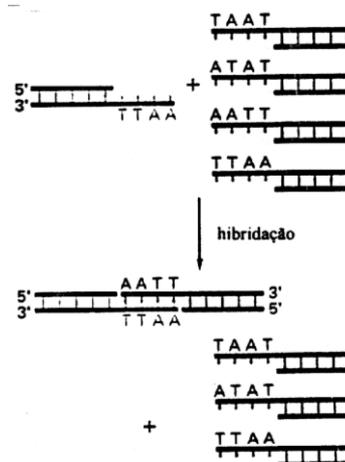


Figura 2. Muitos tipos de enzima de restrição produzem fragmentos de DNA com extremidades coesivas. Esses fragmentos podem se unir pela formação de pontes de hidrogênio entre as bases complementares das extremidades de cadeia simples.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

MANUSEIO DAS ENZIMAS: As enzimas de restrição, como muitas outras enzimas, são mais estáveis a baixas temperaturas e perdem sua atividade se forem aquecidas por um período de tempo prolongado.

TAMPÕES: Os diferentes tipos de enzimas funcionam sob condições diferentes, no que diz respeito à concentração de sal e ao pH. Para que as enzimas atuem sempre no seu ótimo de atividade, elas devem ser utilizadas em conjunto com seus tampões específicos, enviados pelos próprios fabricantes das enzimas, que garantem o seu melhor funcionamento. No caso das enzimas de restrição, existem tampões chamados universais, que servem a várias enzimas ao mesmo tempo. Há situações em que é necessário fazer uma digestão simultânea com mais de uma enzima de restrição; nesses casos, procura-se encontrar um tampão com características intermediárias, adequado ao uso das duas enzimas ao mesmo tempo.

Todos os tampões são usados com concentração final de 1X, mas geralmente são enviados pelos fabricantes concentrados 10X. Para obter uma reação de digestão com concentração final de 1X, o tampão deve ser adicionado em um volume igual a 1/10 do volume final da reação de digestão. Outra opção é preparar uma solução de tampão 2X a partir do inicial de 10X, e adicionar o tampão na reação em um volume igual à metade do volume final da digestão (a regra é $C_1V_1 = C_2V_2$).

Quando se prepara o protocolo de uma reação de digestão, é conveniente que o volume de enzima não exceda 1/10 do volume total da reação. Excesso de glicerol, que está presente no tampão de armazenamento das enzimas, pode reduzir a eficiência da digestão. Quando for necessário colocar um volume maior de enzima na digestão, planeje uma digestão com maior volume total de reação.

Além de reduzir a eficiência, o excesso de glicerol pode ser responsável por artefatos na digestão do DNA, principalmente em se tratando de enzimas de restrição. Esses artefatos são denominados como um todo de **efeito "star"**. O efeito "star" é, em resumo, uma modificação ou um relaxamento nas especificidades de reconhecimento das enzimas de restrição. O efeito é observado quando: existe excesso de enzima; há alterações das concentrações dos íons presentes nas reações de digestão; ou ainda, há alterações de pH. Quando ocorre efeito "star", são originados produtos de digestão inesperados.

PIPETANDO OS REAGENTES: Muitas vezes, os reagentes utilizados depositam-se na forma de gotículas ao redor da tampa ou na parede dos tubos de microcentrífuga. Antes de abrir os tubos, centrifugue-os rapidamente ou bata levemente a base dos mesmos na bancada para as gotículas descenderem e facilitar a pipetagem.

ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO: O padrão de medida das enzimas é a unidade (U). A UNIDADE é definida como a quantidade de enzima necessária para digerir 1 µg de DNA do bacteriófago λ numa reação com volume final de 50 µl durante uma hora a 37°C. A atividade das várias enzimas de restrição varia de lote para lote, e também de um fabricante para outro. A maior parte das enzimas comercializadas vem na concentração de 10-20 U/µl, sendo as de 10 U/µl as mais utilizadas. Embora 10 unidades seja muito mais do que o realmente necessário para a maior parte das reações de digestão (geralmente 1 unidade de enzima para 1 µg de DNA), trabalhar com excesso de enzima pode ser conveniente pois isso garante que não vai ocorrer digestão parcial, mesmo nas condições experimentais abaixo:

1. Para economizar tempo de aula, os tempos de reação podem ser encurtados em 20-30 minutos. O excesso de enzima vai ajudar a não ocorrer digestão parcial.
2. Muitas das enzimas não atuam com 100% da sua atividade nos tampões chamados "intermediários".
3. As enzimas vão perdendo a sua atividade durante o tempo de incubação, às vezes por causa do manuseio inadequado.
4. É fácil cometer erros de pipetagem quando se vai medir somente 1 µl. Os erros mecânicos do pipetador são maiores quando se pipetam volumes menores.

INCUBANDO AS REAÇÕES DE DIGESTÃO: Um banho-maria com temperatura constante pode ser usado para incubar as reações. Os tubos contendo a reação são colocados no banho em uma pequena bóia de isopor perfurada. A temperatura deve ser monitorada com um termômetro.

O tempo mínimo de incubação para uma reação de digestão a 37°C é de 20 minutos. Contudo, as reações com enzimas de restrição podem ser incubadas por muitas horas ou mesmo até o dia seguinte, se você estiver utilizando DNA bem purificado, livre de enzimas que poderiam degradar o DNA da amostra. As enzimas vão perdendo a sua atividade no decorrer das horas e após um certo tempo a reação simplesmente para. As reações podem ser interrompidas quando desejado e podem ser armazenadas em congelador até que você possa continuar o seu experimento. Descongele as reações antes de aplicar as amostras em um gel para eletroforese.

MATERIAL

- enzimas de restrição *Eco RI* e *Hind III*
- DNase
- RNase
- tampão de digestão
- água destilada
- DNA total de *Drosophila*
- DNA plasmidial
- microtubos de 1,5 ml
- micropipetadores P10 e P20 e ponteiras
- recipiente para ponteiras usadas
- microcentrífuga
- caneta marcadora
- estante para tubos de microcentrífuga
- banho-maria a 37°C

PROCEDIMENTO: DIGESTÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (20 MIN, SEGUIDOS DE INCUBAÇÃO)

1. Use a caneta marcadora para identificar, de acordo com as tabelas abaixo, os tubos de microcentrífuga nos quais as digestões serão realizadas (por exemplo, o tubo A do grupo 1= A1).
2. Siga as tabelas abaixo para montar as digestões. Utilize uma **ponteira nova** para adicionar cada um dos componentes da digestão, no entanto não é necessário trocar de ponteira quando se está adicionando o mesmo reagente a vários tubos em seguida. A mesma ponteira pode ser usada para todos os tubos, desde que ela não tenha tocado nenhum dos reagentes já colocados no tubo. As enzimas devem ser o último reagente pipetado em uma reação de digestão.

GRUPOS 1 e 10: Digestão com DNase [1 U/μl]

Tubo	Água	Tampão de digestão (5X)	DNA	Enzima	Volume final
A	11 μl	4 μl	4 μl drosófila	1 μl DNase	20μl
B	7 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	1 μl DNase	20μl
C	12 μl	4 μl	4 μl drosófila	-	20μl
D	8 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	-	20μl

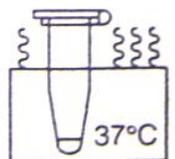
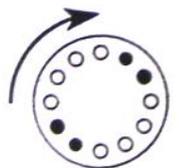
**GRUPOS 2 e 9: Digestão com RNase [5mg/ml]**

Tubo	Água	Tampão de digestão - TE	DNA	Enzima	Volume final
A	7 μl	8 μl	4 μl drosófila	1 μl RNase	20μl
B	3 μl	8 μl	8 μl plasmídeo	1 μl RNase	20μl
C	8 μl	8 μl	4 μl drosófila	-	20μl
D	4 μl	8 μl	8 μl plasmídeo	-	20μl

Sempre adicione o tampão às reações de digestão antes de adicionar as enzimas. As enzimas costumam ser o último reagente pipetado em uma reação de digestão.

GRUPOS 3, 4 e 8: Digestão com *Eco RI* [20U/ μl]

Tubo	Água	Tampão de digestão (5X)	DNA	Enzima	Volume final
A	11 μl	4 μl	4 μl drosófila	1 μl <i>Eco RI</i>	20μl
B	7 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	1 μl <i>Eco RI</i>	20μl
C	12 μl	4 μl	4 μl drosófila	-	20μl
D	8 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	-	20μl

**GRUPOS 5, 6 e 7: Digestão com *Hind III* [10U/μl]**

Tubo	Água	Tampão de digestão (5X)	DNA	Enzima	Volume final
A	11 μl	4 μl	4 μl drosófila	1 μl <i>Hind III</i>	20μl
B	7 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	1 μl <i>Hind III</i>	20μl
C	12 μl	4 μl	4 μl drosófila	-	20μl
D	8 μl	4 μl	8 μl plasmídeo	-	20μl

As enzimas perdem a atividade após várias horas de incubação, então a reação de digestão para.

3. Feche as tampas dos tubos. Misture os reagentes centrifugando rapidamente na microcentrífuga ou batendo o fundo dos tubos na bancada.
4. Coloque os tubos no banho-maria a 37°C e incube-os por 90 minutos ou mais.
5. Após a incubação, acrescente 2 μl de tampão de aplicação e carregue as amostras em um gel de agarose para eletroforese. *Este passo será executado pelos monitores.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Compare os resultados das digestões com RNase e DNase. Qual a conclusão com relação à natureza do material extraído?
2. O que aconteceu com o DNA total de *Drosophila* após as digestões com as enzimas de restrição?
3. O que aconteceu com o DNA plasmidial após as digestões com as enzimas de restrição?
4. Quantos sítios de restrição para as enzimas utilizadas existem no DNA plasmidial e total?
5. Quais as semelhanças ou diferenças entre os dois tipos de DNAs, total e plasmidial?
6. Quais as semelhanças e/ou diferenças entre os plasmídeos extraídos pelos grupos 1-5 e 6-10? Trata-se do mesmo plasmídeo? Como verificar isso?
7. É possível determinar os tamanhos desses plasmídeos?

UNIDADE 6

MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO

Objetivos específicos:

- Interpretar o padrão de fragmentos obtidos após digestão com enzimas de restrição, de moléculas de DNA circulares e lineares.
- Elaborar um mapa de restrição da molécula circular de DNA com base na análise de fragmentos de restrição em gel de agarose.

Construir um mapa de restrição de uma molécula de DNA significa posicionar os sítios de clivagem de enzimas de restrição uns em relação aos outros. Para tanto é necessário realizar digestões simples e combinadas (duas ou mais enzimas atuando simultaneamente sobre o mesmo DNA) e analisar o padrão de bandas obtido no gel de eletroforese. Verifica-se então o tamanho dos fragmentos gerados e a relação entre os fragmentos que desapareceram ou surgiram nas digestões combina-

das. É importante saber que a soma dos tamanhos dos fragmentos deve ser sempre igual em qualquer tipo de digestão, pois se trata da mesma molécula de DNA, cujo tamanho não varia. Qualquer alteração no tamanho total pode significar que fragmentos pequenos foram perdidos durante a eletroforese, existem bandas duplas ou ocorreram digestões parciais.

EXERCÍCIOS INTRODUTÓRIOS

1. Um fragmento linear de DNA é clivado com as enzimas de restrição *Hind* III e *Sma* I, separadamente, e depois com uma combinação das duas enzimas. Os fragmentos obtidos são:

<i>Hind</i> III	2,5 kb e 5,0 kb
<i>Sma</i> I	2,0 kb e 5,5 kb
<i>Hind</i> III e <i>Sma</i> I	2,5 kb; 3,0 kb e 2,0 kb

- a. Desenhe o mapa de restrição.
 - b. A mistura de fragmentos produzidos pelas enzimas combinadas é clivada com a enzima *Eco* RI, resultando na perda do fragmento de 3 kb e o aparecimento de uma banda correspondente a um fragmento de 1,5 kb. Marque o sítio de clivagem de *Eco* RI no mapa de restrição.
2. A digestão de um determinado plasmídeo com enzimas de restrição originou os fragmentos mostrados na tabela abaixo. Desenhe o mapa de restrição. Represente-o linearmente aberto no ponto de clivagem da enzima *Eco* RI. Indique em kb, as distâncias entre os sítios de restrição.

Enzimas de restrição	Tamanho dos fragmentos (kb)
<i>Eco</i> RI	4,0
<i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III	1,0; 3,0
<i>Eco</i> RI + <i>Bgl</i> II	0,8; 3,2
<i>Hind</i> III + <i>Bgl</i> II	0,2; 3,8

3. O genoma de um determinado bacteriófago corresponde a uma única molécula linear de DNA dupla fita. O DNA do fago foi digerido com três diferentes enzimas de restrição em várias combinações. Digestões simples com as enzimas A, B e C resultaram nos seguintes fragmentos quando o DNA digerido foi analisado em gel:

Enzima A	Enzima B	Enzima C
10 kb	3 kb	15 kb
40 kb	47 kb	35 kb

Digestões duplas (combinações de duas enzimas) produziram os seguintes fragmentos:

Enzimas A + B	Enzimas A + C	Enzimas B + C
3 kb	10 kb	3 kb
7 kb	15 kb	15 kb
40 kb	25 kb	32 kb

Use os resultados acima para ordenar os sítios de restrição para estas três enzimas no genoma do bacteriófago.

4. O plasmídeo DED3 é um vetor utilizado para propagar DNA exógeno dentro da bactéria. Quando o DNA do plasmídeo é submetido a digestão com enzimas de restrição, são produzidos fragmentos com os seguintes tamanhos:

<i>Eco</i> RI: 10,5 kb	<i>Bam</i> HI: 3,2 kb 7,3 kb	<i>Hind</i> III: 10,5 kb
<i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III: 1,9 kb 8,6 kb	<i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI: 0,6 kb 3,2 kb 6,7 kb	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III: 1,3 kb 1,9 kb 7,3 kb

Quantos sítios de restrição existem para cada enzima individual? Posicione em um mapa de restrição os sítios de corte para as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBR322

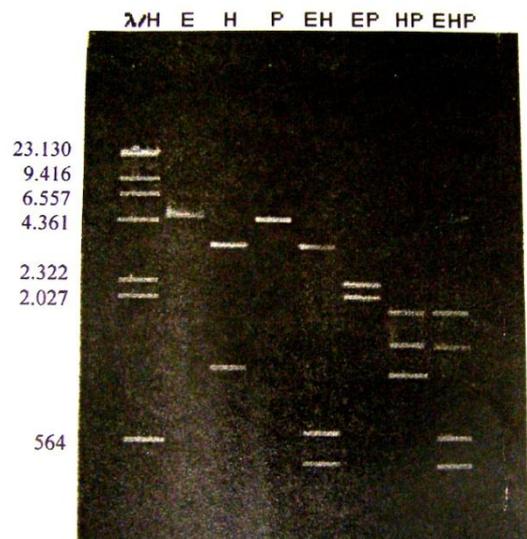
Nessa aula construiremos o mapa de restrição do plasmídeo pBR322. Esse foi o primeiro plasmídeo produzido artificialmente para ser usado rotineiramente em experimentos de DNA recombinante. Para que um plasmídeo possa ser utilizado como um vetor de clonagem, as coordenadas dos sítios de restrição de várias enzimas devem ser precisamente determinadas, especialmente no que diz respeito a sequências funcionais, tais como origem de replicação e os genes que conferem resistência a antibióticos. O mapeamento de restrição é também o primeiro passo na caracterização de fragmentos de DNA que se deseja ligar a um vetor (clonagem).

O procedimento para mapear sítios no plasmídeo pBR322 que está descrito a seguir, serve para o mapeamento de qualquer plasmídeo circular. Inicialmente, será determinado o número e as posições relativas dos sítios de corte de três enzimas de restrição – *Eco* RI, *Hinc* II e *Pvu* II no plasmídeo pBR322. Amostras de pBR322 foram incubadas a 37°C em digestões simples, duplas e triplas com as três enzimas de restrição citadas. A seguir, cada amostra foi aplicada em uma raia de um gel de agarose, juntamente com o DNA do fago λ digerido com *Hind* III (marcador de tamanho). Após a eletroforese, o gel foi corado e fotografado.

Use a figura ao lado para resolver as questões a seguir:

1. Construa o mapa de restrição do pBR322, mostrando os sítios de corte de *Eco* RI, *Hinc* II e *Pvu* II.

- Os resultados das digestões simples indicam o número de sítios de corte de cada enzima na molécula de pBR322. Uma vez que a digestão *Eco* RI originou um único fragmento, deve haver apenas um sítio *Eco* RI, e o tamanho do fragmento deve corresponder ao tamanho do plasmídeo.
 - Inicialmente, compare os resultados de cada digestão simples de uma determinada enzima com as digestões duplas. Determine quais são as bandas presentes na digestão simples e as que estão faltando nas digestões duplas. A soma de pares de bases de dois fragmentos na digestão dupla deve ser igual ao tamanho em pb do fragmento que estiver faltando. Desse modo, esse procedimento indica a localização relativa dos sítios de corte de duas enzimas.
 - Você deverá construir mapas alternativos colocando os sítios de corte para as enzimas nas duas possíveis orientações relativas aos sítios de outra enzima. Uma das orientações deverá originar fragmentos de tamanho que melhor se encaixem nos resultados obtidos.
 - Para testar o seu mapa, verifique se as distâncias entre os sítios de corte no mapa correspondem às bandas no gel em cada digestão, simples, dupla ou tripla.
2. Este tipo de procedimento fornece uma estimativa de tamanho dos fragmentos de restrição. Como os tamanhos podem ser calculados com maior precisão?



Os tamanhos das bandas geradas em cada digestão são:

Eco RI – 4,4 Kb
Hinc II – 3,3 e 1,1 Kb
Pvu II – 4,4 Kb
Eco RI + *Hinc* II – 3,3; 0,6 e 0,5 Kb
Eco RI + *Pvu* II – 2,3 e 2,1 Kb
Hinc II + *Pvu* II – 1,8; 1,5 e 1,1 Kb
Eco RI + *Hinc* II + *Pvu* II – 1,8; 1,5; 0,6; e 0,5 Kb

UNIDADE 7

MÉTODO RÁPIDO DE TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* COM DNA PLASMIDIAL

Objetivos específicos:

- Transformar *E. coli* com plasmídeo.
- Identificar as colônias transformadas.

Esta aula apresenta um método rápido de preparação de células de *E. coli* para que possam ser utilizadas em experimentos de transformação. As células bacterianas são tratadas de modo a se tornarem “competentes” a incorporar DNA exógeno.

Amostras de células de *E. coli* são colhidas de uma placa de ágar nutritivo (LB) e ressuspendidas em tubos contendo uma solução de cloreto de cálcio. A seguir uma alíquota de plasmídeos é adicionada em um dos tubos e estes são incubados a 0°C por 15 minutos. Após um rápido choque térmico a 37°C, as células são

resfriadas, meio de cultura LB é adicionado e as amostras das suspensões de células são plaqueadas em meios LB e LB contendo antibiótico.

As placas são incubadas por 12-24 horas a 37°C e então examinadas quanto ao crescimento bacteriano. Apenas as células que foram transformadas crescerão em placas contendo antibiótico. Divisões subsequentes de uma célula resistente ao antibiótico produzirão uma colônia de bactérias resistentes. Portanto, cada colônia em uma placa com antibiótico representa um único evento de transformação.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

Veja as “Notas Introdutórias” do Apêndice I referente às técnicas de assepsia e cultura de *E. coli*.

PROTOCOLO PARA A TRANSFORMAÇÃO: A maioria dos protocolos de transformação pode ser dividida em quatro passos principais:

1. **Pré-incubação:** As células são ressuspendidas em uma solução de cátions e incubadas a 0°C. Acredita-se que nesse processo, os cátions interajam com os fosfatos negativos da membrana celular da *E. coli* facilitando a entrada do DNA.
2. **Incubação:** o DNA é adicionado e a suspensão de células é novamente incubada a 0°C.
3. **Choque de temperatura:** A suspensão de células/DNA é brevemente incubada a 37°C e então novamente submetida a 0°C. A alteração rápida de temperatura gera um desequilíbrio térmico entre os dois lados da membrana de *E. coli*, o qual provavelmente cria um fluxo que arrasta os plasmídeos para o interior da célula.
4. **Recuperação:** Meio LB é adicionado à suspensão de células/DNA que é, então, incubada a 37°C (de preferência com agitação) antes do plaqueamento em meio seletivo. As células transformadas recuperam-se do tratamento, multiplicam o plasmídeo transformado, e começam a expressar a proteína de resistência ao antibiótico (Figura 1).

SIMPLIFICAÇÕES DA TRANSFORMAÇÃO: Um procedimento clássico de transformação de colônias emprega todos os passos acima. No entanto, apenas a incubação

com o DNA e o choque térmico são passos absolutamente essenciais. Para economizar tempo, o método simplificado omite dois passos não essenciais: da pré-incubação e recuperação, no entanto, dependendo do gene de resistência a certos antibióticos, a recuperação se faz necessária.

O PLASMÍDEO pBR322

As especificações do plasmídeo pBR322 já foram apresentadas na Unidade 6. Este plasmídeo será aqui utilizado para a demonstração do processo de transformação bacteriana.

SELEÇÃO PELO ANTIBIÓTICO: A ampicilina interfere na construção da camada de peptidoglicano da parede celular e mata apenas células em replicação, que estão produzindo novos envelopes celulares. As células que não estão se replicando, isto é, que possuem envelopes celulares intactos, não são afetadas. Portanto, as células podem ser plaqueadas em meio contendo ampicilina diretamente após o choque de temperatura, omitindo-se o passo de recuperação. As células transformadas podem ser recuperadas na presença da ampicilina, porque a maioria delas expressa a proteína para a resistência antes de se dividir.

PLACA DE *E. coli*: Placas estriadas com *E. coli* são a fonte das células bacterianas a serem usadas nessa aula. Para a obtenção de melhores resultados, deve-se utilizar células imediatamente após uma incubação de 12 horas a 37°C. Entretanto, bons resultados podem também ser obtidos quando as células são armazenadas à temperatura ambiente por 1-2 dias.

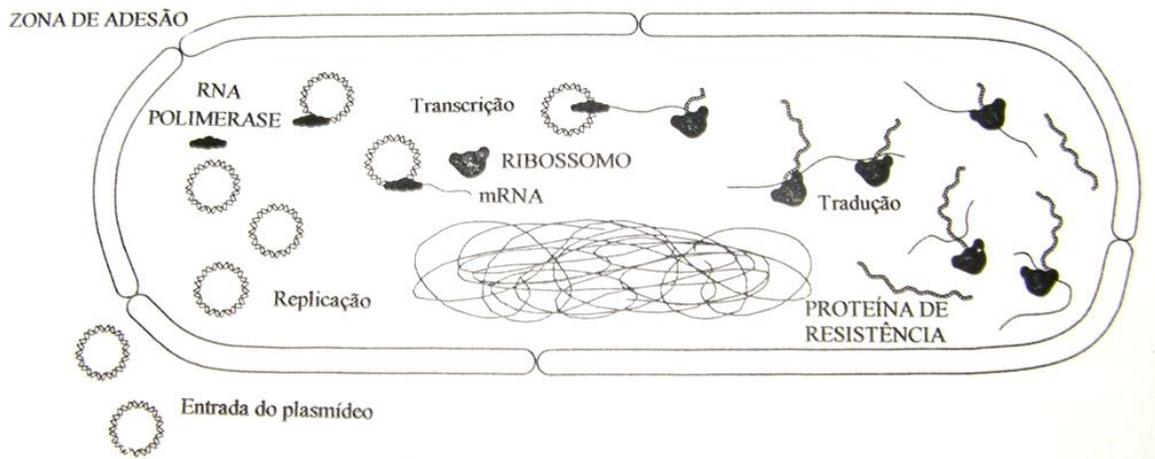


Figura 1. Esquema representando a entrada e replicação do plasmídeo e a transcrição e tradução de uma proteína de resistência a um antibiótico.

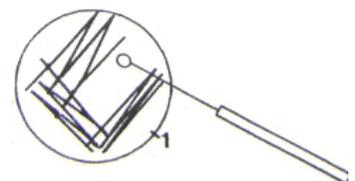
MATERIAL

- placa LB com *E. coli*
- alíquota do plasmídeo pBR322 (5ng/μl)
- CaCl₂ 50 mM
- meio LB
- placas LA
- placas LB
- alça de inoculação
- micropipetadores P10, P20, P200 e P1000 e ponteiros
- 2 tubos de cultura de 15 ml, estéreis
- recipiente para descarte de ponteiros e tubos de microcentrífuga
- solução de desinfetante
- bico de Bunsen
- alça de Drigalski
- caneta marcadora
- suporte para tubos de ensaio
- estufa a 37°C
- banho-maria a 37°C
- frasco com álcool
- recipiente com gelo moído

PROCEDIMENTO: PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO (40 min).

Todo procedimento deve ser realizado sob condições assépticas. Veja as técnicas de assepsia no Apêndice I: "Técnicas de cultura bacteriana".

1. *Acenda o bico de Bunsen.*
2. Use uma caneta marcadora para anotar em um tubo de cultura estéril de 15 ml o sinal de + e em outro o sinal de -, significando com e sem adição de plasmídeo, respectivamente. Identifique os tubos com o número do seu grupo.
3. Use um micropipetador P1000 com uma *ponteira estéril* para adicionar 250 μl da solução CaCl₂ em cada tubo.
4. Coloque os 2 tubos no gelo.
5. Use uma alça de inoculação estéril para transferir uma grande massa de células (enchá a alça) da placa inicial para o tubo + e para o tubo -, seguindo os passos:
 - a. Raspe gentilmente a estria, o suficiente para formar na alça de inoculação uma massa de células bem visível. Tenha cuidado para não transferir ágar durante o processo (impurezas podem inibir a transformação).
 - b. Mergulhe a alça *diretamente na solução de CaCl₂* do tubo. Desloque a massa celular girando vigorosamente o bastão da alça entre seus dedos polegar e indicador. Levante o tubo contra a luz para verificar se a massa de células se despreendeu na solução de CaCl₂. Certifique-se de que a massa de células não permaneceu na alça ou na parede do tubo.



CUIDADO! No próximo passo mantenha o nariz e a boca afastados da ponteira quando pipetando cultura em suspensão, para evitar a inalação de qualquer aerossol que tenha se formado.

6. Ressuspenda imediatamente as células nos tubos, pipetando com o auxílio de um P1000 com ponteira estéril. Faça a suspensão entrar e sair da ponteira várias vezes:
 - a. Pipete cuidadosamente para evitar a formação de bolhas na suspensão ou espirrar a suspensão nas paredes do tubo.
 - b. Enxugue qualquer condensação no fundo do tubo e levante-o contra a luz para verificar se a suspensão está homogênea. A suspensão deve estar ligeiramente leitosa e desprovida de grumos visíveis de células.
7. Devolva os tubos para o gelo.
8. Use um micropipetador P10 para adicionar 10 μl de pBR322 (15ng/ μl) diretamente na suspensão de células no **tubo +**. Em seguida bata levemente com o dedo na extremidade do tubo para misturar a suspensão. Evite fazer bolhas na suspensão ou espirrá-la na parede do tubo.
9. Devolva o tubo + para o gelo. Incube os dois tubos no gelo por 15 minutos.
10. *Apague o bico de Bunsen.*
11. Enquanto as células estão incubando no gelo, use uma caneta marcadora para fazer as seguintes anotações nas placas:
 - Sinal de “+” : marque em uma placa LB e uma LA
 - Sinal de “-” : marque em uma placa LB e uma LA
 - Anote também o número do grupo e letra da turma nas 4 placas.
12. Após 15 minutos de incubação, dê um choque térmico nas células dos 2 tubos. *As células devem receber um choque preciso.*
 - a. Leve o recipiente com gelo até o banho-maria. Remova os tubos do gelo e imediatamente mergulhe-os no banho a 37°C por 5 minutos.
 - b. Devolva imediatamente os tubos para o gelo, por no mínimo mais um minuto.
13. Coloque os tubos em um suporte à temperatura ambiente.
14. *Acenda o bico de Bunsen.*
15. Use o P1000 com uma ponteira estéril para adicionar 500 μl de meio LB a cada tubo. Bata levemente com o dedo nos tubos para misturar a solução.
16. Use o micropipetador P200 com uma ponteira estéril para adicionar 100 μl da suspensão das células de cada tubo em suas respectivas placas marcadas. *Não permita que a suspensão fique depositada nas placas por muito tempo antes de proceder ao passo seguinte.* Siga a tabela abaixo como uma lista de controle do procedimento de espalhamento das células nos diferentes tipos de placas:

	(+) CÉLULAS TRANSFORMADAS	(-) CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS
LB	100 μl	100 μl
LA	100 μl	100 μl

17. Esterilize o espalhador (alça de Drigalski) e espalhe as células sobre a superfície de cada placa seguindo os passos abaixo:
 - a. Mergulhe a alça em um frasco com álcool e passe-a brevemente sobre a chama de um bico de Bunsen para inflamar o álcool. Deixe o álcool terminar de queimar.
 - b. Levante a tampa da placa de ágar, como uma concha, apenas o suficiente para permitir o espalhamento.
 - c. Esfrie a alça tocando a parte interna da tampa da placa de Petri.
 - d. Toque com a alça na suspensão de células e gentilmente movimente-a para frente e para trás sobre a superfície do ágar. Gire a placa (1/4 de giro) e torne a repetir os movimentos.
 - e. Recoloque a tampa. Coloque a alça no etanol, flambe-a e deixe esfriar antes de colocá-la sobre a bancada.
18. Deixe as placas por vários minutos sobre a bancada para permitir a absorção da suspensão.
19. *Apague o bico de Bunsen.*
20. Passe uma fita crepe sobre o conjunto de placas e incube-as a 37°C durante 12-24 horas. Após esse período de incubação as placas serão guardadas a 4°C para interromper o crescimento das células de *E. coli* e diminuir o crescimento de qualquer contaminante.

Não permita que as células fiquem por muito tempo depositadas antes de espalhá-las, pois ficarão adsorvidas em pontos concentrados. O objetivo é distribuí-las homogênea-mente.

A alça, ao ser submersa em álcool, já está estéril. O único propósito de usar a chama é o de queimar o álcool excedente antes de espalhar as células. Não deixe a alça superaquecer diretamente sobre a chama do bico de Bunsen por vários segundos, pois no próximo espalhamento poderá matar as células de *E. coli*.

21. Limpe a bancada:

- a) Separe as placas, tubos e ponteiras que estiveram em contato com *E. coli*.
- b) Deixe os tubos de 15ml na estante da bancada. Coloque as ponteiras na solução de Lysoform que se encontra na sua bancada.
- c) Limpe a bancada com etanol.
- d) Lave as mãos antes de deixar o laboratório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observe as colônias de células através do fundo das placas de Petri e marque com uma caneta as colônias que são bem visíveis. Se as placas forem incubadas por um tempo maior ou deixadas à temperatura ambiente por vários dias, pequenas colônias "satélites" podem ser observadas, irradiando das bordas das colônias grandes, bem estabelecidas. Colônias "satélite" não resistentes crescem em uma "sombra de antibiótico", na qual o antibiótico foi degradado pela colônia resistente maior. Não inclua as colônias satélite no seu cálculo de transformantes. Nos tubos controle (LB) colônias individuais não podem ser visualizadas devido a um crescimento confluyente das células, formando uma camada ou tapete de bactérias.

Um total aproximado de 50 a 500 colônias deverá ser observado na placa +LA.

1. Anote na tabela abaixo o número de colônias observado em cada placa. Se o crescimento foi muito denso, impedindo a contagem de colônias individuais, anote "camada". Os resultados estão como você esperava? Explique as possíveis razões para variações em relação ao esperado.

	(-) CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS	(+) CÉLULAS TRANSFORMADAS
LB		
LA		

2. Compare o crescimento de colônias entre os seguintes pares de placas abaixo. O que cada par de resultados revela sobre o experimento?

- + LB / - LB
- - LA / - LB
- + LA / - LA
- + LA / + LB

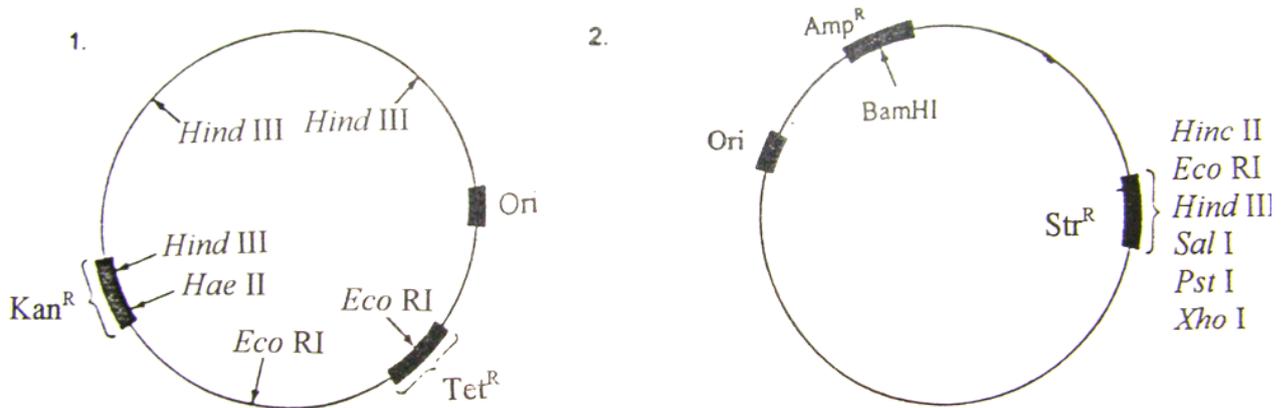
EXERCÍCIOS

1. Você deseja clonar em um dos plasmídeos abaixo representados, um fragmento do fago lambda. O fragmento em questão possui cerca de 2000 pares de bases e é originado após a digestão do fago com a enzima *Hind* III. Você tem de planejar o experimento para a obtenção do clone desejado.

a. Como você procederia para isolar o fragmento que você deseja clonar?

b. Qual é o plasmídeo mais indicado para ser usado como vetor de clonagem neste caso? Justifique.

c. Quais seriam os passos necessários para a clonagem? Indique a enzima de restrição usada para digerir o plasmídeo, o fenótipo das células hospedeiras e os meios de cultura a serem usados.



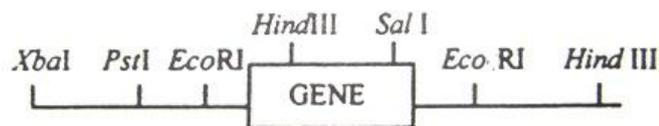
2. Suponha agora que você deseja clonar um fragmento *Hae* III de 4,5 kb em um dos plasmídeos acima. As enzimas *Hae* III e *Hinc* II originam extremidades em fundo cego; as demais enzimas cortam de modo assimétrico gerando extremidades coesivas.

a. Qual seria o plasmídeo mais indicado?

b. Quais seriam os passos necessários para a clonagem? Indique a enzima de restrição usada para digerir o plasmídeo, o fenótipo das células hospedeiras e os meios de cultura a serem usados.

c. Observe que a distribuição dos sítios de restrição nos dois plasmídeos difere bastante. Você vê alguma vantagem para o fato de os sítios de restrição estarem agrupados dentro de um único gene que confere resistência a antibiótico?

3. Você está trabalhando em um grupo de pesquisa que estuda a estrutura e a função de um determinado gene. Sua tarefa é a de clonar o gene em questão. O mapa de restrição da região cromossômica que contém o gene já é conhecido e está representado abaixo. O passo inicial é o da preparação de clones portadores do gene inteiro. Descreva como você se prepararia para construir esses clones no plasmídeo 2 (acima representado), indicando as enzimas de restrição, meios de cultura e células hospedeiras que você utilizaria.



4. Quando se usa plasmídeos bacterianos como vetor de clonagem, porque é útil inserir o fragmento de DNA a ser clonado em um sítio de restrição localizado dentro de um dos genes que conferem resistência a antibiótico?

5. Quais são as características essenciais que um plasmídeo deve possuir para ser usado como um vetor de clonagem?

6. No contexto da Biologia Molecular, o que é um fragmento de DNA clonado? O que é DNA recombinante?

Kan^R = resistência à canamicina

Tet^R = resistência à tetraciclina

Ori = origem de replicação

Amp^R = resistência à ampicilina

Str^R = resistência à estreptomicina

UNIDADE 8

A TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Objetivos específicos:

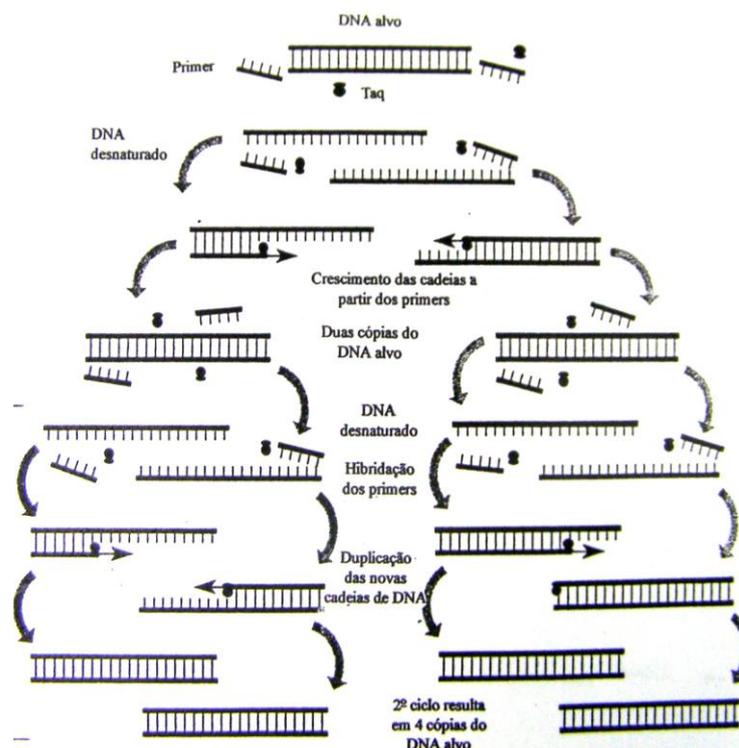
- Conhecer os princípios básicos da técnica de PCR.
- Montar uma reação de PCR a partir de DNA extraído de células da bochecha.
- Avaliar a potencialidade de emprego da técnica de PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite detectar uma única sequência de DNA específica, dentro do panorama de um genoma complexo. A PCR é basicamente uma reação de duplicação do DNA realizada em tubo de ensaio e repetida várias vezes. Para a amplificação seletiva de uma sequência alvo, utiliza-se a enzima essencial de duplicação do DNA celular, a DNA polimerase. Também é fundamental à reação a presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores da reação, os “primers”. Eles geralmente são sequências curtas de DNA fita simples, com cerca de 20-30 nucleotídeos de comprimento. Os “primers” servem como ponto de ancoragem para que a DNA polimerase possa iniciar a reação. Os “primers” delimitam as fronteiras da região que deve ser amplificada. Um dos “primers” é complementar a uma sequência de bases localizada no começo da região alvo, e o segundo é complementar a uma sequência localizada no fim da região alvo, na cadeia complementar ou antiparalela do DNA.

Para se fazer uma reação de PCR, uma pequena quantidade do DNA alvo é adicionada a uma solução tamponada contendo a DNA polimerase, os “primers”, os quatro desoxirribonucleotídeos constituintes do DNA (dNTPs) e o íon Mg^{++} . A mistura de reação de PCR é então submetida a cerca de 40 ciclos de replicação “in vitro”. A cada ciclo, o número de cópias da região-alvo se duplica. Na verdade, cada ciclo de duplicação de DNA na PCR consiste em 3 passos principais:

1. Desnaturação: alguns minutos à temperatura de 94-96°C, período no qual o DNA é desnaturado e fica em simples fita.
2. Hibridação: alguns minutos a 50-65°C, período no qual os “primers” se hibridam às moléculas do DNA alvo, através de pontes de hidrogênio.
3. Extensão: alguns minutos a 72°C, período em que a polimerase se liga aos “primers” e faz a extensão das cadeias complementares ao DNA molde, que estão sendo recém-sintetizadas.

Reação em cadeia de polimerase:



Nesta aula, a reação em cadeia da polimerase será utilizada para amplificar um pequeno fragmento de DNA do cromossomo 8 humano.

A amostra de DNA molde para a amplificação é oriunda de milhares de células obtidas através de um bochecho com solução salina (um procedimento não invasivo e que evita o manuseio de sangue em sala de aula). As células são concentradas através de centrifugação e ressuspendidas em uma solução contendo a resina chamada “Chelex” que se liga a íons metálicos capazes de inibir a reação de PCR. As células são então lisadas através de fervura e em seguida centrifugadas para a remoção dos restos celulares. Uma amostra de sobrenadante contendo o DNA genômico é misturada à *Taq* polimerase, uma polimerase de DNA especial para PCR, aos oligonucleotídeos que servem de “primers” para a reação, aos quatro desoxirribonucleotídeos e ao cofator Mg^{++} . São então utilizados os ciclos de temperatura para desnaturar o DNA alvo da amplificação, hibridar os primers e estender a cadeia de DNA recém-sintetizada.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

AS INOVAÇÕES DA PCR: Quando foi inicialmente concebida, a PCR era uma tarefa tediosa uma vez que as mudanças sucessivas de temperaturas requeriam a transferência manual dos tubos de reação entre banhos-maria com temperaturas diferentes. Além disso, mais DNA polimerase devia ser acrescentada a cada ciclo de temperatura, pois à temperatura de desnaturação do DNA molde, a DNA polimerase também ficava desnaturada. Duas inovações muito importantes fizeram com que a PCR se tornasse tão popular e fácil de aplicar em laboratórios do mundo todo. A primeira foi a purificação de uma DNA polimerase obtida de uma bactéria termófila, *Thermus aquaticus*, que habita fontes de água quente. A *Taq* polimerase permanece ativa mesmo após os sucessivos ciclos de amplificação que exigem altas temperaturas para a desnaturação do DNA; logo, é necessário adicionar a enzima somente uma vez, no início da reação. Além disso, foram inventados os termocicladores automáticos de DNA, que controlam os sucessivos ciclos de temperatura requeridos para a PCR.

A ESCOLHA DOS PRIMERS: O sucesso de um experimento de PCR depende muito da escolha inicial dos oligonucleotídeos utilizados como primers. É importante que se escolham primers altamente específicos, ou seja, que hibridem em apenas uma única região de interesse. Se um oligonucleotídeo tem 10 bases, a probabilidade de que exista uma sequência ao acaso com a qual ele hibride é de $(1/4)^{10}$, ou seja, cerca de 1 em um milhão. No genoma humano existem cerca de 3 bilhões de pares de bases, o que faria com que esses “primers” hibridassem com cerca de 3 mil sítios. Um oligonucleotídeo com 16 bases ou mais hibridará com um sítio único. Estas estimativas são feitas imaginando-se que um genoma tenha sequências aleatórias de bases, o que está longe da verdade, mas serve como uma estimativa preliminar.

TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO DOS PRIMERS: Os primers se hibridam ao DNA molde em temperaturas entre

50-65°C. Três variáveis determinam a temperatura ideal e o tempo necessário para esta hibridação ocorrer: (1) quantidade dos “primers”; (2) comprimento dos “primers”; (3) a sequência de bases dos “primers”. Geralmente, a temperatura de hibridação adequada é cerca de 5°C abaixo da T_m dos “primers”, onde T_m (*Melting Temperature*) é definida como a temperatura em que 50% das moléculas de dupla hélice do DNA estão desnaturadas. A T_m de um primer pode ser estimada atribuindo-se 4°C para cada G ou C, e 2°C para cada A ou T. Em última análise, se necessário, a temperatura ótima de hibridação pode ser determinada experimentalmente.

50-65°C. Três variáveis determinam a temperatura ideal e o tempo necessário para esta hibridação ocorrer: (1) quantidade dos “primers”; (2) comprimento dos “primers”; (3) a sequência de bases dos “primers”.

Geralmente, a temperatura de hibridação adequada é cerca de 5°C abaixo da T_m dos “primers”, onde T_m (*Melting Temperature*) é definida como a temperatura em que 50% das moléculas de dupla hélice do DNA estão desnaturadas. A T_m de um primer pode ser estimada atribuindo-se 4°C para cada G ou C, e 2°C para cada A ou T. Em última análise, se necessário, a temperatura ótima de hibridação pode ser determinada experimentalmente.

PCR E CONTAMINAÇÕES: A PCR é uma técnica extremamente sensível, capaz de detectar a presença e amplificar uma única molécula de DNA. Por isso, é fundamental obedecer rotinas laboratoriais rigorosas para evitar a contaminação da PCR com outras amostras ou com o produto da amplificação das reações prévias.

O ideal é iniciar os experimentos de PCR em um determinado local e realizar a análise do produto amplificado, como por exemplo, as eletroforeses, em um outro local. Os manipuladores devem sempre usar luvas descartáveis e, se possível, usar ponteiras especiais com filtros que bloqueiam a contaminação com os aerossóis oriundos das amostras pipetadas.

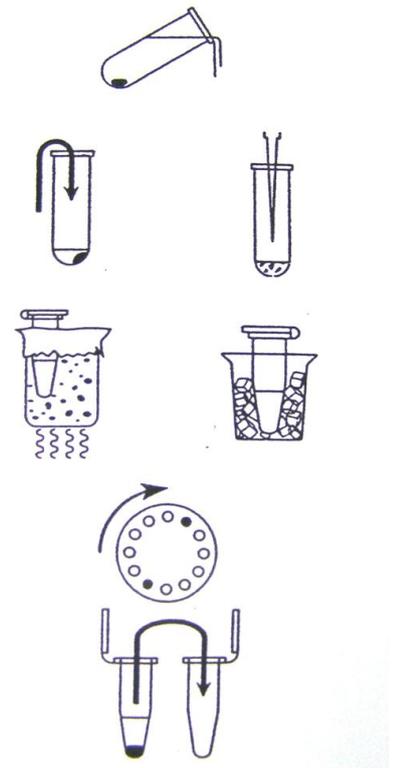
A MISTURA DE REAÇÃO DE PCR (PCR MIX): A mistura de reação para PCR (Mix) é composta por tampão de PCR, dNTPs, “primers” e a *Taq* polimerase. A *Taq* polimerase se mantém estável pelo menos por 1 ano na ausência de íons magnésio. O DNA alvo da amplificação e o cloreto de magnésio são adicionados separadamente à mistura de reação, para iniciar a PCR. Associações não específicas entre os “primers” podem acontecer imediatamente após a adição do cloreto de magnésio, de modo que a máquina já deve estar previamente programada e todos os alunos devem terminar de preparar a reação simultaneamente. Trabalhe rapidamente e inicie os ciclos de temperatura logo após terminar de adicionar todos os reagentes.

MATERIAL

- copos descartáveis
- cloreto de sódio 0,9%
- tubos de 15 ml
- tubos de 1,5 ml
- tubos de PCR de 0,25 ml
- Chelex 10%
- micropipetadores P10, P20, P200 e P1000
- ponteiros descartáveis
- recipiente para descarte de ponteiros
- banho com água fervente
- centrífuga clínica
- microcentrífuga
- água destilada
- mistura de reação para PCR solução
- recipiente com gelo moído
- pinças
- máquina de PCR (termociclador)
- luvas descartáveis
- TBE 1x
- agarose 2% em TBE
- aparato de eletroforese
- marcador molecular 100 pb
- corante de aplicação de eletroforese
- 1 µg/ml de brometo de etídeo

PROCEDIMENTO A: EXTRAÇÃO DE DNA DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL (30 min)

1. Use uma caneta para marcar seu grupo e turma num tubo de centrífuga de 15 ml contendo a solução salina.
2. Coloque toda a solução salina na boca e faça bochechos vigorosos durante 10 segundos. Guarde o tubo de 15 ml para a próxima etapa do experimento.
3. Cuspa a solução salina no copo descartável. Então, derrame-a cuidadosamente de volta no tubo de 15 ml.
4. Feche bem a tampa do tubo e coloque-o para centrifugar em uma posição equilibrada. Centrifugue a 500-1000 g por 10 minutos para precipitar as células no fundo do tubo de centrífuga.
5. Com muito cuidado para não ressuspender as células precipitadas, descarte na pia o sobrenadante o máximo que puder. Coloque o tubo com o precipitado de células no gelo.
6. Utilize um micropipetador P1000 para adicionar 500 µl de Chelex 10% ao precipitado:
 - a. pipetar várias vezes com o micropipetador P1000 para ressuspender bem o Chelex antes de usar;
 - b. antes que o Chelex volte a precipitar, transfira 500 µl com o micropipetador P1000 para o tubo com o precipitado de células.
7. Ressuspenda as células em Chelex, pipetando a solução para cima e para baixo várias vezes com o micropipetador. Verifique se não restaram grumos de células.
8. Transfira 500 µl da amostra ressuspensa com o micropipetador P1000 para um tubo de microcentrífuga limpo, identificado com a letra da turma e o número do grupo.
9. Incube a amostra no banho com água fervente durante 10 minutos.
10. Após a incubação, utilize uma pinça para remover o tubo do banho com água fervente e resfrie-o no gelo por aproximadamente 1 minuto.
11. Coloque o tubo na centrífuga, em configuração equilibrada, e centrifugue por 30 segundos para precipitar o Chelex no fundo do tubo.
12. Transfira 100 µl do sobrenadante com o micropipetador P200 para um tubo de microcentrífuga limpo, identificado com a letra da turma e o número do grupo. Coloque o tubo no gelo. Evite transferir Chelex nesse procedimento.



PONTO DE PARADA: As amostras de DNA obtido da mucosa bucal podem ser congeladas a -20°C até que seja possível continuar o experimento. As amostras podem ser estocadas por várias semanas dessa maneira, para uso em experimentos futuros.

A PCR é uma técnica muito sensível: use sempre luvas descartáveis para evitar contaminação da reação.

PROCEDIMENTO B: PREPARO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE DNA DO CROMOSSOMO 8 (5 min)

1. Use a caneta para identificar a tampa e a lateral de um tubo de 0,25 ml próprio para PCR.
2. Use a tabela abaixo para adicionar os reagentes ao tubo de PCR. Use uma ponteira limpa para cada um dos reagentes.

Reagentes	Mistura de reação (com MgCl ₂)	Amostra de DNA
Quantidade	20 µl	10 µl

3. Tampe o tubo e o coloque no termociclador para a amplificação da região de interesse. O programa a ser usado consiste em:

35 ciclos de repetição das seguintes etapas:

94°C por um minuto
57°C por 45 segundos
72°C por 30 segundos

Ligações inespecíficas dos *primers* começam quase imediatamente após a adição de magnésio. É preciso trabalhar rápido e iniciar os ciclos de temperatura logo após a adição dos reagentes.

Os próximos passos serão realizados pelos monitores.

PROCEDIMENTO C: PREPARO DO GEL DE AGAROSE A 1.8%

1. Derrame gentilmente a solução de agarose recém-aquecida na bandeja até atingir a altura de 5 mm. O gel deve cobrir até cerca de 1/3 da altura do pente. Depois que a agarose solidificar, retire as fitas adesivas e coloque a bandeja com o gel na cuba de eletroforese.

PROCEDIMENTO D: APLICAÇÃO DO GEL E ELETROFORESE

1. Adicione 3 µl do tampão de aplicação aos 30 µl da amostra amplificada e aplique-a no gel.
2. Aplique o controle não amplificado e o marcador de peso molecular no gel, segundo o procedimento abaixo:
Adicione 3 µl do tampão de aplicação aos 30 µl do controle não amplificado e ao marcador de peso molecular.
3. Submeta as amostras a uma corrida de 100 Volts por cerca de 30 minutos. A separação ideal deve ser atingida quando as bandas do azul de bromofenol tiverem migrado cerca de 3 cm a partir dos poços.
4. Desligue a fonte de eletroforese, remova a bandeja contendo o gel e transfira o gel para um recipiente onde vai ser feita a coloração com o brometo de etídeo.

PROCEDIMENTO E: COLORAÇÃO DO GEL COM BROMETO DE ETÍDEO, OBSERVAÇÃO DO RESULTADO E FOTOGRAFIA

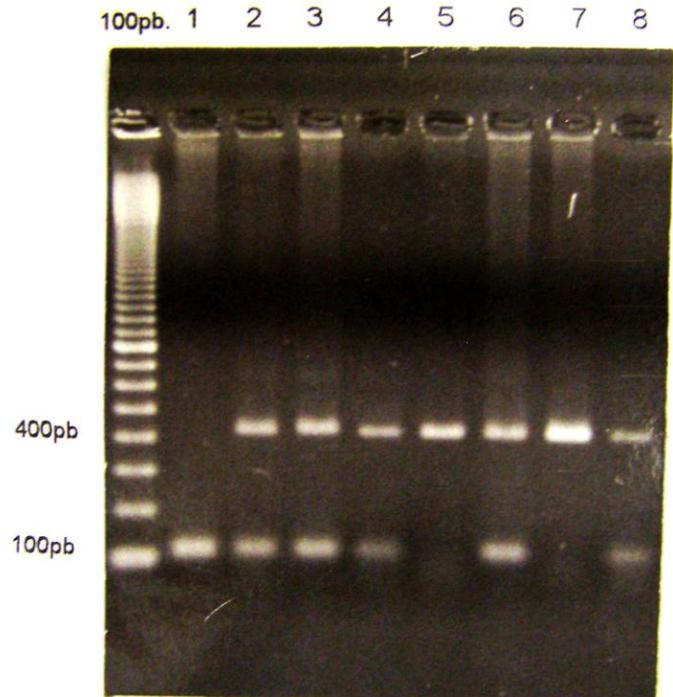
Proceda à coloração do gel segundo os protocolos estabelecidos na Unidade 4 sobre "Eletroforese".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Observe a fotografia do gel corado contendo produtos da PCR (1 a 8) e o marcador de peso molecular 100pb. Oriente a foto com os poços sempre para cima. Em primeiro lugar, veja se consegue observar uma banda difusa, de baixo peso molecular e que aparece em todas as raias: ela é formada por dímeros de "primers". Excluindo as bandas de "primers", interprete as demais bandas presentes nas raias.

ANÁLISE DA FOTO DO GEL IDEAL

- Se nenhuma banda é visível: Isto geralmente resulta de um erro durante o procedimento de obtenção do DNA, como por exemplo, o preparo de uma solução de Chelex muito ácida (pode também resultar de um erro no preparo da mistura de reação de PCR).
- Se apenas uma banda é visível: Compare a migração da banda com as bandas de 400 pb e 100 pb do padrão de peso molecular. Se este produto de PCR apresentar cerca de 400 pb, então o indivíduo é homozigoto para a inserção de *Alu* (+/+). Se o produto de PCR possuir cerca de 100 pb, então o indivíduo é homozigoto para a ausência da inserção de *Alu* (-/-).
- Se duas bandas são visíveis: Compare o tamanho dos produtos com as bandas de 100 e 400 pb do marcador. Se um produto corresponder a cerca de 400 pb e o outro a cerca de 100 pb, então o indivíduo é heterozigoto para a inserção (+/-).
- Se três ou mais bandas são visíveis: As bandas mais fortes devem ser os produtos verdadeiros da PCR. Bandas adicionais podem aparecer quando os primers se ligam inespecificamente a outras regiões do genoma que não o loco TPA, originando produtos de amplificação não específicos.



2. Determine a distribuição genotípica da classe. Por que todos os resultados não foram idênticos?

A coexistência na população de mais do que uma variante é chamada de **polimorfismo genético**. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é por definição polimórfico. Se pensarmos em termos de fenótipo, o polimorfismo compreende a existência de alelos selvagens e mutantes, em uma população; os alelos mutantes possuem alterações que alteram o produto de um gene, alterando o fenótipo. Entretanto, nem toda variação do material genético acarreta obrigatoriamente uma mudança do fenótipo. Parte dessa variação não afeta o fenótipo, ainda que localizada dentro dos genes. Uma grande quantidade de variações está presente no DNA entre os genes, ou seja, em regiões não codificadoras.

Essas variações que não afetam o fenótipo podem ser evidenciadas como alterações dos tamanhos dos fragmentos de restrição, caracterizando os RFLPs ou também podem ser estudadas através da reação da polimerase em cadeia, como no experimento realizado.

O objetivo do experimento foi pesquisar a presença da inserção de uma pequena sequência de DNA, chamada sequência *Alu*, localizada dentro de um gene denominado de ativador de plasminogênio tissular (TPA), localizado no cromossomo 8 humano.

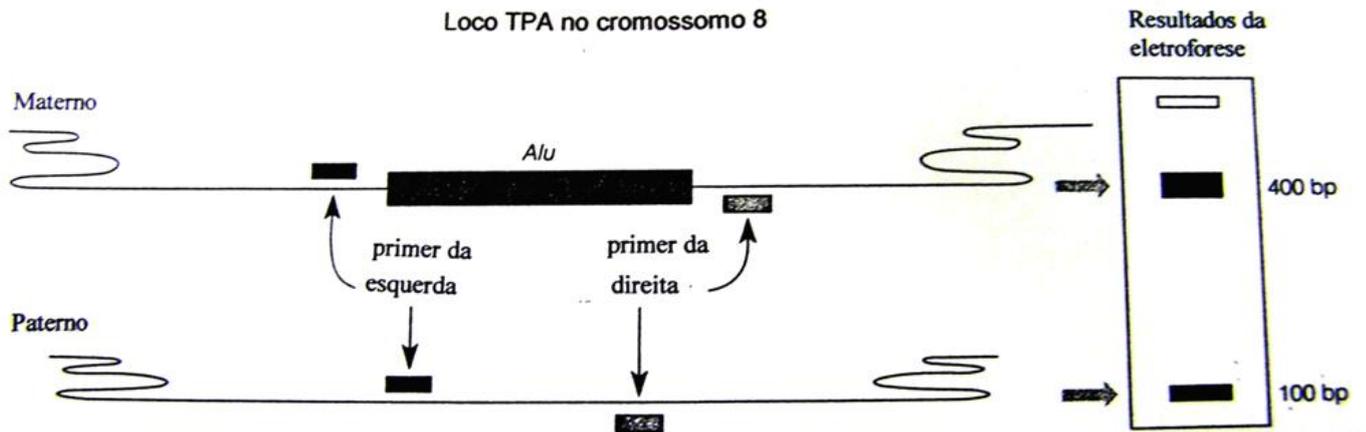
A família *Alu* é uma família de sequências curtas de DNA repetitivas e dispersas no genoma dos primatas. Os elementos *Alu* têm cerca de 300 pares de bases de comprimento e seu nome deriva da presença de um único sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Alu* I, localizado no meio dessa sequência. Nos últimos 65 milhões de anos, os elementos *Alu* se propagaram através de um processo de transposição mediado por RNA e atingiram o número de 500.000 cópias no genoma humano, o que corresponde a 10% do genoma total.

Cerca de 500-2000 elementos *Alu* estão principalmente restritos ao genoma humano. Alguns desses elementos foram inseridos recentemente no genoma no último milhão de anos, e não estão fixados na espécie humana, caracterizando então um polimorfismo na população. Um desses elementos *Alu*, chamado TPA-25, é encontrado dentro de um intron do gene que codifica o ativador de plasminogênio tissular. Essa inserção é dimórfica, ou seja, está presente em alguns indivíduos, mas não em outros. Como a sequência *Alu* está localizada em um intron, ela não afeta a expressão do

gene TPA e é fenotipicamente neutra. A técnica de PCR foi nesse caso empregada para se estudar a presença ou a ausência desta inserção.

Neste experimento, foi utilizado um par de "primers" flanqueando o sítio da inserção, que amplifica um fragmento de 400 pares de bases quando TPA-25 está presente e um fragmento de 100 pares de bases quando TPA-25 está ausente. Cada um dos três possíveis genótipos, homocigotos para ausência de TPA-25, heterocigotos e homocigotos para a presença de TPA 25 puderam ser facilmente identificados quando os fragmentos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose.

O primer 5'-GTAAGAGTTCCGTAACAGGACAGCT-3' delimita um dos lados do loco TPA e o primer 5'-CCCCACCCTAGGAGAACTTCTCTTT-3' delimita a outra extremidade. O tamanho dos produtos amplificados depende da presença ou da ausência da inserção de *Alu* em cada uma das cópias do cromossomo 8.



UNIDADE 9

A TÉCNICA DE “SOUTHERN BLOTTING”

Objetivos específicos:

- Conhecer os princípios básicos da técnica de “Southern blot”.
- Interpretar um experimento de “Southern blot”.
- Avaliar a potencialidade de emprego da técnica de “Southern blot”.

A hibridação de DNA pela técnica de “Southern” permite a visualização de fragmentos específicos de DNA entre todos os fragmentos que compõem um genoma complexo. Nessa técnica, o DNA genômico é digerido por uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são separados por eletroforese. Os fragmentos de DNA são então transferidos do gel para uma membrana e a seguir expostos a uma solução contendo uma **sonda**, ou seja, uma molécula de ácido nucleico de fita simples, que seja complementar em sequência ao fragmento que se tem interesse em detectar. Uma sonda pode ser um oligonucleotídeo sintético, um plasmídeo onde foi clonada uma sequência de interesse ou ainda um RNA.

A dupla hélice da molécula de DNA é mantida através das pontes de hidrogênio formadas entre os pares de bases complementares adenina-timina e guanina-citosina. As temperaturas acima de 90°C ou a pHs superiores a 10,5 essas pontes de hidrogênio são rompidas, separando as fitas complementares, o que corresponde à desnaturação da molécula de DNA. Em condições adequadas de sal, temperatura e pH, as fitas complementares podem renaturar-se, recompondo assim a molécula de DNA original. Esse processo onde fitas simples alinham-se e formam moléculas em dupla fita é conhecido por *hibridação*.

Como mencionado anteriormente, pode-se empregar uma sonda de DNA fita simples para reconhecer e hibridar com sua sequência complementar em uma amostra de DNA genômico (ou outros alvos). Para que isso seja possível, a sonda deve ser marcada por radioatividade, cor ou quimioluminescência com o objetivo de permitir a sua visualização. Sob condições restritivas de reação (“high stringency”), moléculas de DNA de fita dupla estáveis serão formadas apenas quando houver um perfeito emparelhamento de bases ao longo de todo o segmento que hibrida, ou seja, entre a sonda e o DNA alvo. Sob condições de reação não muito severas (“low stringency”), moléculas estáveis de DNA podem se for-

mar em regiões de hibridação parcial, onde as fitas da sonda e do DNA alvo forem complementares.

Nessa aula, a técnica de “Southern blotting” será utilizada para localizar os genes ribossomais no genoma de *Drosophila melanogaster*. Na Parte I, “Extração, digestão e fracionamento do DNA genômico”, o DNA genômico de *Drosophila* será extraído e submetido a digestões simples e duplas com as enzimas *EcoRI* e *Hind* III. Os fragmentos de restrição resultantes serão separados por eletroforese em gel de agarose e corados por brometo de etídeo para permitir que sejam visualizados.

Na Parte II “Transferência por *Southern blotting* dos fragmentos de DNA genômico”, o gel será incubado em uma solução de hidróxido de sódio para desnaturar os fragmentos de restrição em fitas simples. Após uma neutralização os fragmentos serão então transferidos para a superfície de uma membrana de nylon por ação da capilaridade, na técnica denominada “blotting”. Em seguida a membrana será lavada, seca ao ar, e o DNA será a ela fixado por incubação a 70°C.

Na Parte III, para proceder-se à “Hibridação da sonda”, a membrana deverá ser pré-hibridada com uma proteína com ação bloqueadora, que prevenirá a ligação da sonda com sítios não específicos da membrana de nylon. A seguir, a membrana será incubada com a sonda, que no caso dessa aula corresponde a um clone (pDm238), contendo os genes ribossomais de *Drosophila*, marcada com o esteróide de planta, a digoxigenina.

Em seguida, na Parte IV referente à “Detecção de sondas não radioativas”, a membrana será lavada e incubada com um anticorpo anti-digoxigenina. Esse anticorpo irá ligar-se à digoxigenina incorporada na sonda durante a marcação. O imunocomplexo resultante pode ser detectado por uma reação colorida iniciada pela enzima fosfatase alcalina, que está ligada ao anticorpo. Um precipitado de cor marrom-púrpura indicará as áreas da membrana onde houve ligação da sonda com os fragmentos de restrição contendo as sequências de DNA complementares.

NORTHERN E WESTERN BLOT

Algumas vezes há humor na Ciência. Na década de 1970, E.M. Southern desenvolveu um método para localizar uma sequência particular de DNA dentro de uma mistura complexa. A técnica foi denominada “Southern Blotting”. Como trocadilho, os pesquisadores que introduziram um método semelhante para analisar RNA denominaram-no “Northern Blot”. O

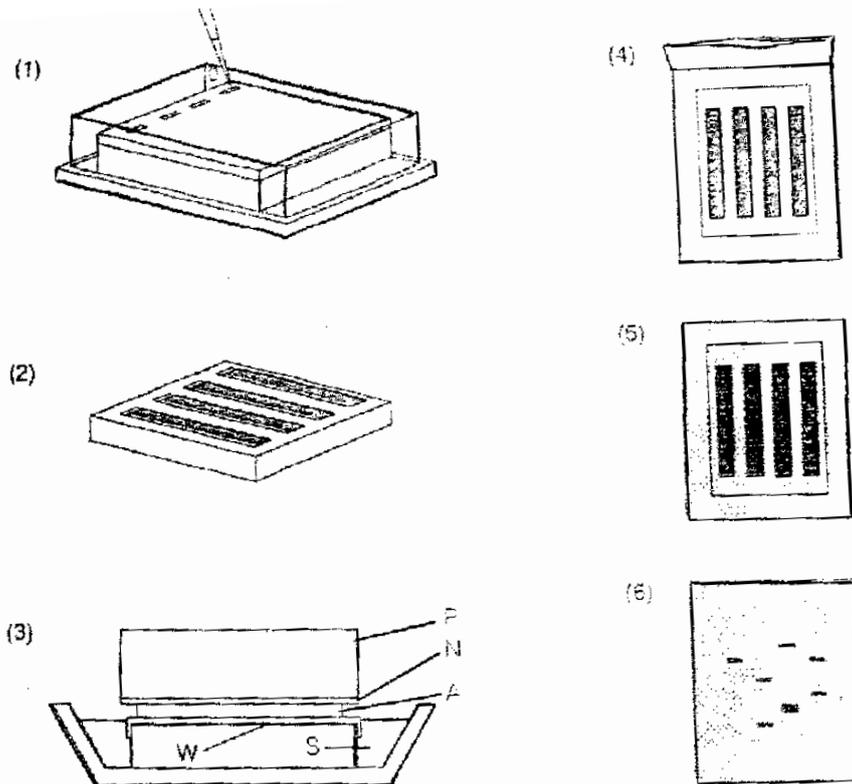
procedimento e a teoria do “Northern Blot” são quase idênticos aos do Southern, exceto que se analisa RNA ao invés de DNA. Um procedimento similar envolvendo “blotting” de proteínas é denominado “Western Blot”.

“Northern Blot” é um método para a detecção e quantificação de níveis de RNA mensageiro. Ele fornece uma comparação relativa da abundância de

uma dada mensagem numa amostra de RNA proveniente de organismos, tecidos ou conjuntos de células. É um método amplamente usado para a determinação do tamanho do transcrito, para estudar a expressão gênica tecido-específica e para a detecção de transcritos originados por *splicing* alternativo. As amostras de RNA são inicialmente separadas por tamanho por meio de eletroforese em gel de agarose, sob condições desnaturantes (formaldeído ou glioxal são usados como desnaturante). O RNA é então transferido para uma membrana positivamente carregada, imobilizado

por meio de alta temperatura ou luz ultravioleta e, subsequentemente, hibridado com sonda marcada.

“Western Blot” é uma técnica empregada para a detecção de proteínas. As proteínas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana, a qual é hibridada com anticorpos específicos e marcada. É empregada em estudos que visam identificar e quantificar proteínas, fornecendo evidências sobre a expressão gênica.



LEGENDA

- (1) Aplique o DNA digerido no gel de agarose e submeta à eletroforese.
 (2) Visualize o DNA e desnature-o no interior no gel.
 (3) Transfira o DNA para uma membrana de nylon por ação da capilaridade:

P = papel toalha
 N = membrana de nylon
 A = gel de agarose
 S = solução concentrada de sal
 W = ponte de papel de filtro

- (4) Hibride a sonda com a membrana que, se corada, será uma imagem especular do gel.
 (5) Lave a membrana e revele as bandas usando um sistema de detecção baseado em uma reação colorimétrica
 (6) A revelação da membrana mostra a localização das bandas às quais a sonda ligou-se.

PARTE I. DNA GENÔMICO DE *Drosophila melanogaster*: EXTRAÇÃO, DIGESTÃO E FRACIONAMENTO

NOTAS INTRODUTÓRIAS

GENOMAS COMPLEXOS: Em um experimento típico de "Southern blotting", 7 a 10 µg de DNA genômico são submetidos à digestão por uma ou mais enzimas de restrição. Uma endonuclease que reconhece sequência

de 6 pares de bases, como a usada nessa aula, estatisticamente cortam uma vez a cada 4.096 pares de bases (4⁶), produzindo muitos milhares de fragmentos de restrição em genomas de eucariontes superiores, como mostrado na tabela abaixo.

Organismo	Tamanho do genoma em PB (haplóide, monoplóide)	Número de fragmentos de restrição
λ	48.502	12
<i>E. coli</i>	4.600.000	1.123
Levedura	12.000.000	2.929
<i>C. elegans</i>	100.000.000	24.414
<i>Arabidopsis</i>	119.000.000	29.052
<i>Drosophila</i>	140.000.000	34.179
Camundongo	2.731.000.000	666.748
Homem	3.102.000.000	757.324

Após a eletroforese e coloração por brometo de etídeo, o DNA genômico proveniente de organismos complexos irá produzir um "rastros" composto de muitos milhares de fragmentos de restrição nos quais fragmentos individuais não são detectados. Entretanto, a hibridação

de um "Southern blot" é suficiente para detectar uma determinada sequência dentre alguns milhares de fragmentos de restrição que compõem um genoma complexo.

O DNA genômico de *Drosophila* foi extraído de acordo com o protocolo apresentado na Unidade 2, "Extração de DNA Total" e digerido segundo a tabela abaixo:

Tubo	DNA <i>Drosophila</i>	tampão (2x)	<i>EcoR</i> I	<i>Hind</i> III	água
E	7 µl	2,5 µl	1 µl	-	14,5 µl
H	7 µl	2,5 µl	-	1 µl	14,5 µl
E/H	7 µl	2,5 µl	1 µl	1 µl	13,5 µl
controle	7 µl	2,5 µl	-	-	15,5 µl

Após incubação a 37°C durante no mínimo 3 horas as reações de digestão foram aplicadas em um gel de agarose 0,8% e submetido a eletroforese. O gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Examine a fotografia do seu gel corado. Observe em todas as raias o "rastros" composto por milhares de fragmentos de restrição de diferentes tamanhos.
2. Se você tivesse submetido DNA de λ às mesmas digestões utilizadas para o DNA de *Drosophila*, qual seria o aspecto esperado após a eletroforese e coloração do gel?

PARTE II. TRANSFERÊNCIA ATRAVÉS DE "SOUTHERN BLOTTING" DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *Drosophila*

NOTAS INTRODUTÓRIAS

MÉTODOS DE "BLOTTING": Três métodos são normalmente utilizados para a transferência de ácidos nucleicos de géis para membranas de nitrocelulose ou nylon: capilaridade, eletroforese ou transferência a vácuo. Embora cada método tenha certas vantagens, nós recomendamos o método da capilaridade porque ele não requer o emprego de equipamentos especiais e será o utilizado nessa unidade.

O método da capilaridade foi introduzido por Edwin Southern em 1975 e faz uso do fluxo de um tampão de transferência

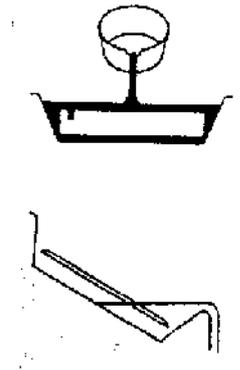
para depositar os fragmentos de DNA em uma membrana. Uma pilha de papel toalha seco age como um mata-borrão que suga o tampão através de um sanduíche gel/membrana. Os pequenos fragmentos de DNA são eficientemente transferidos em cerca de 1 hora enquanto os fragmentos mais longos que 15.000 pb requerem uma transferência de cerca de 12 horas ou mais, e mesmo assim podem não ser completamente transferidos.

MATERIAL

- água destilada
- tampão de desnaturação
- tampão de neutralização
- tampão 10xSSC
- tampão 2x SSC
- lápis especial
- bequer 400 ml
- luvas descartáveis
- pinças
- pedaços de papel de filtro
- bandeja de montagem do gel
- fita crepe
- membrana de nylon
- papel toalha
- membrana de PVC
- recipientes plásticos
- tesoura
- peso
- estufa a 70°C

PROCEDIMENTO A: DESNATURAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO DO DNA (60 min)

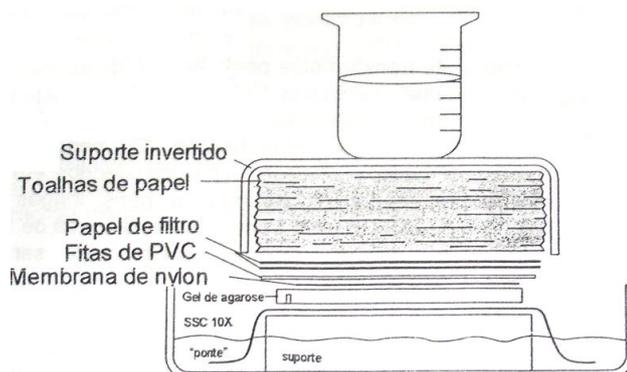
1. Usando luvas descartáveis, transfira o gel de agarose para um recipiente plástico pequeno. Cubra o gel com 100 ml do tampão de desnaturação (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M). Periodicamente, agite o recipiente por 15 minutos.
2. Escorra o tampão desnaturante e coloque novamente 100 ml desse tampão. Periodicamente, agite o recipiente por 15 minutos.
3. Escorra o tampão desnaturante e enxague brevemente o gel com 100 ml de água destilada.
4. Escorra a água destilada e adicione 100 ml de tampão de neutralização (Tris 0,5 M, pH 7,5, NaCl 1,5 M). Agite periodicamente durante 15 minutos.
5. Escorra o tampão de neutralização e substitua-o por 100 ml do mesmo tampão. Agite periodicamente o gel por mais 15 minutos.

**PROCEDIMENTO B: MONTAGEM DO "BLOTTING" E TRANSFERÊNCIA DO DNA PARA UMA MEMBRANA DE NYLON (20 min; transferência de 12 horas)**

1. Coloque a bandeja usada para montagem do gel (ou outro suporte que tenha o tamanho aproximado do gel), invertida, dentro de um grande recipiente de plástico. Adicione cerca de 500 ml de SSC 10x; o nível do tampão deve ser inferior ao topo da bandeja que está sendo utilizada como suporte.
2. Coloque um papel filtro longo o suficiente sobre o suporte dentro da bandeja de modo que as extremidades do papel estejam submersas em tampão (Veja Figura que ilustra a montagem da transferência por "Southern blotting").
3. Remova o gel de agarose da solução de neutralização (Procedimento A). Vire o gel de modo que a face que contém as fendas de aplicação fique voltada para baixo, e coloque-o no centro do papel de filtro saturado em tampão.
4. Use luvas descartáveis e pinça para manusear a membrana de nylon. Identifique a membrana. Molhe a membrana fazendo-a flutuar e em seguida submergindo-a em um recipiente com 2xSSC.
5. Coloque a membrana de nylon molhada sobre o gel. Cuidadosamente alinhe a a borda superior da membrana com a linha de poços do gel (veja figura). *Com o dedo enluvado retire qualquer bolha de ar que por acaso tenha ficado presa entre a membrana e o gel.*
6. Centralize dois pedaços de papel de filtro sobre a membrana de nylon.
7. Centralize uma pilha de cerca de 5 cm de papel toalha sobre o papel de filtro.
8. Inverta um pequeno recipiente plástico e coloque-o sobre a pilha de papel toalha.
9. Coloque cuidadosamente um bequer com 400 ml de água (ou outro volume com peso equivalente) sobre a bandeja invertida. A transferência deve ocorrer por pelo menos 12 horas.



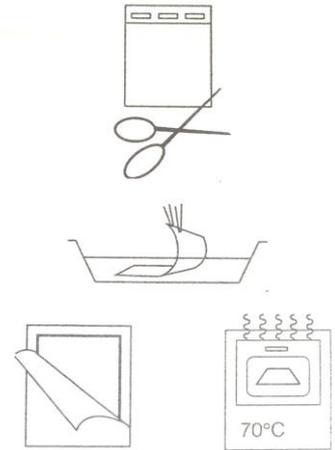
Nunca toque a membrana de nylon com as mãos sem luvas. O óleo de sua pele irá se depositar na membrana e pode impedir a ligação do DNA.



O peso do bequer com água pressiona o sanduíche gel/membrana, o papel de filtro e o papel toalha, colocando-os em íntimo contato e facilitando o fluxo capilar que se formará durante o "blotting".

PROCEDIMENTO C: LAVAGEM E INCUBAÇÃO DA MEMBRANA (60 min)

1. Remova a pilha de papel toalha (que estará saturada com tampão), os papéis de filtro e o filme de PVC.
2. Com a membrana de nylon ainda em contato com o gel, use uma tesoura para cortar o canto inferior direito do sanduíche gel/membrana.
3. Use uma pinça para retirar a membrana da superfície do gel. Transfira a membrana para um recipiente plástico contendo 100 ml de SSC 2x. Agite por 1 minuto.
4. Transfira a membrana para um pedaço de papel de filtro limpo (12 x 14 cm). Deixe secar ao ar por 5 minutos.
5. Coloque a membrana entre dois pedaços de papel de filtro (12 x 14 cm). Feche as quatro laterais com fita e identifique com seu nome esse envelope.
6. Leve à estufa a 70°C por 30 minutos ou mais.



PONTO DE PARADA: Após incubação da membrana ela pode ser armazenada indefinidamente à temperatura ambiente.

PARTE III. HIBRIDAÇÃO DA Sonda

NOTAS INTRODUTÓRIAS

CONDIÇÕES DE HIBRIDAÇÃO: Hibridações com genoma eucarionte são geralmente feitas a 65°C em solução aquosa ou a 42°C na presença de formamida 50%. Ambos os métodos fornecem resultados comparáveis.

REAGENTES DE BLOQUEIO: Todos os protocolos empregam um reagente para bloquear a ligação não específica da sonda à membrana. O reagente de bloqueio geralmente contém uma proteína, como por exemplo a albumina de soro bovino ou leite em pó desnatado, frequentemente combinada com um agente desnaturante, fragmentos de DNA de esperma de salmão e um detergente, como SDS por exemplo.

VANTAGENS DE UMA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA: As sondas para hibridação podem ser fragmentos de restrição, plasmídeos contendo uma sequência de interesse ou um oligonucleotídeo sintético. Tradicionalmente, os pesquisadores utilizam sondas marcadas por radioatividade (P^{32}) e detectadas por autoradiogramas; uma técnica onde a membrana hibridada é colocada em contato com um filme de raio-X, que é impressionado nas posições correspondentes à hibridação com a sonda. Sondas marcadas por radioatividade, embora extremamente sensíveis, apresentam várias desvantagens. Uma vez que a vida média do P^{32} é de apenas 14 dias, a utilização de uma sonda marcada por radiação fica limitada a algumas semanas. Além disso, o uso de radiação requer uma licença de uso e exige uma infra-estrutura de proteção e descarte adequada.

Por essa razão, a maioria dos pesquisadores abandonaram as sondas radioativas. Sistemas de detecção colorimétricos e quimioluminescentes não

exigem licença especial e não apresentam os mesmos perigos da radioatividade. Os sistemas colorimétricos empregam digoxigenina ou biotina, os resultados podem ser observados diretamente e a revelação da cor pode ser monitorada. Os sistemas quimioluminescentes, embora seguros e mais sensíveis, requerem exposição e revelação de filme de raio X em câmaras escuras, além de um monitoramento mais trabalhoso.

OBTENÇÃO E MARCAÇÃO DA Sonda: A sonda utilizada nesse experimento corresponde a um clone denominado pDM 238. O clone possui um inserto de aproximadamente 12 Kb que contém os genes que codificam os rRNAs de *Drosophila*. Esse segmento de DNA foi excisado do genoma de *Drosophila melanogaster* com a enzima *Eco* RI e inserido no vetor pBR322 digerido com *Eco* RI.

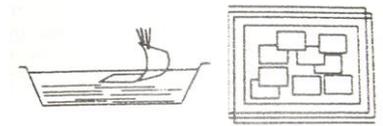
A sonda será marcada por digoxigenina que é incorporada ao DNA através de uma reação de síntese de DNA *in vitro*. O primeiro passo para essa marcação consiste na linearização do DNA do clone pDM 238 através de digestão com uma enzima de restrição. Em seguida, a amostra é fervida durante 10 minutos para que ocorra a desnaturação do DNA. Ao DNA em fita simples, são adicionados "primers" sintéticos, compostos por 6 nucleotídeos em várias combinações das bases nitrogenadas. Esses "primers" emparelham-se às fitas simples de DNA, nas regiões onde há complementariedade e servem como iniciadores para a síntese de DNA. Em seguida, adicionam-se à mistura acima descrita, os quatro tipos de desoxirribonucleotídeos (um deles marcado com digoxigenina), tampão e a enzima polimerase I do DNA. O DNA sintetizado *in vitro* conterá moléculas de digoxigenina incorporada nas fitas recém-sintetizadas.

MATERIAL

- tampão de pré-hibridação
- tampão de hibridação
- luvas descartáveis
- pinças
- recipientes plásticos
- banho-maria a 65°C

**PROCEDIMENTO A: PRÉ-HIBRIDAÇÃO DA MEMBRANA DE NYLON
(5 min seguidos de 60 min de incubação)**

1. Usando luvas descartáveis, remova a membrana de nylon do sanduíche montado no Procedimento C, e transfira-a para um recipiente contendo tampão de pré-hibridação. *Se a membrana estiver aderida ao papel de filtro, não tente separá-los; coloque ambos no tampão de pré-hibridação e, em seguida, separe-os.*
2. Incube sob leve agitação, a 68°C com solução de pré-hibridação durante 60 minutos ou durante a noite. Cubra o recipiente para prevenir evaporação.

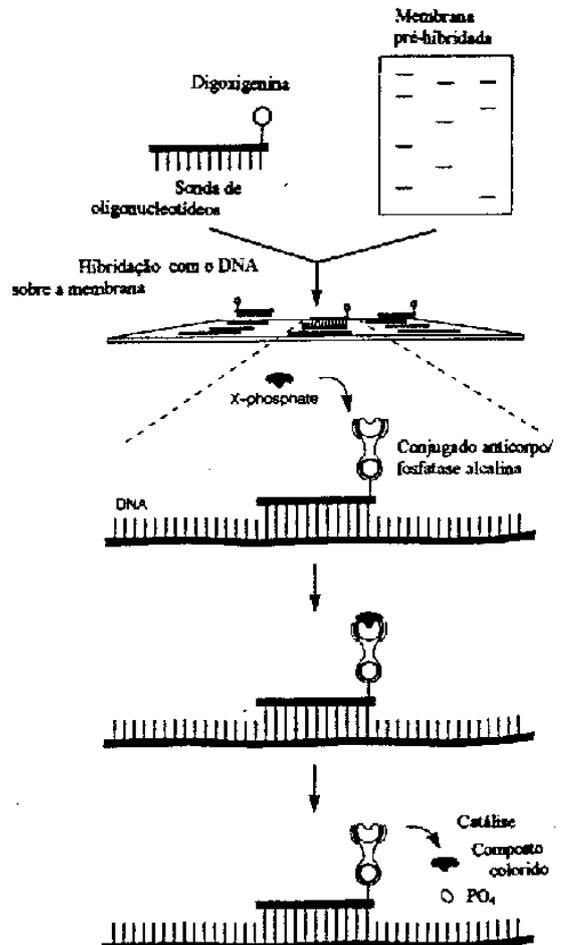
**PROCEDIMENTO B: HIBRIDAÇÃO DA MEMBRANA DE NYLON
(5 min seguidos de 120 min de incubação)**

1. Usando luvas, transfira a membrana de nylon para um recipiente contendo o tampão de hibridação e a sonda de DNA desnaturada.
2. Incube sob leve agitação, a 68°C por pelo menos duas horas ou durante a noite. Cubra o recipiente para prevenir evaporação.

PARTE IV. DETECÇÃO DA SONDA NÃO RADIOATIVA**NOTAS INTRODUTÓRIAS**

PREPARAÇÃO DO ANTICORPO E DETECÇÃO COLO-RIMÉTRICA: O conjugado anticorpo/enzima é usado para ligar-se à digoxigenina que foi previamente incorporada na sonda, produzindo assim um complexo imunológico. Em um passo separado, o complexo é detectado por duas reações que produzem cor. Inicialmente, a fosfatase alcalina cataliza a remoção do grupo fosfato do 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato); o produto de oxidação resultante dimeriza para formar um precipitado de cor azul índigo. Os íons gerados durante a dimerização reduzem um segundo composto, o "nitro blue tetrazolium" (NBT), formando um precipitado de cor púrpura. A quantidade dos dois precipitados que se deposita na membrana é proporcional à massa do alvo presente.

O conjugado anticorpo/enzima não diluído é estável a 4°C. *Não congele.* O conjugado diluído deverá permanecer estável por cerca de 12 horas a 4°C. Os substratos X-fosfato e NBT são estáveis a -20°C.



MATERIAL

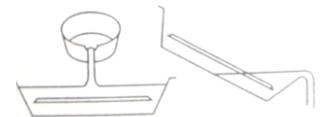
- tampão de lavagem (2X SSC, 0,1% SDS)
- tampão 1 (Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M)
- tampão 2 (tampão 1 + reagente de bloqueio a 1%)
- solução diluída de anticorpo/enzima
- tampão 3 (Tris 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M)
- solução para revelação da cor
- tampão TE
- luvas descartáveis
- papel de filtro
- pinças com pontas achatadas
- placa de Petri
- pequenos recipientes plásticos
- banho-maria a 42°C

PROCEDIMENTO: LAVAGEM E REVELAÇÃO DA COR (70 min; mais 10 min para a revelação)

Uma agitação manual lenta deve acompanhar cada lavagem (incubação), exceto o procedimento de revelação da cor do passo 11.

1. Usando luvas e pinças, remova a membrana da solução de hibridação* (parte C), e transfira-a para um pequeno recipiente plástico contendo 100 ml de tampão de lavagem. Incube por 5 minutos à temperatura ambiente.
2. Despeje o tampão da primeira lavagem e substitua-o por 100 ml de tampão de lavagem fresco. Incube, com agitação, por 5 minutos à temperatura ambiente.
3. Repita o passo 2.
4. Despeje o tampão de lavagem e adicione 100 ml de tampão 2. Incube, sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.
5. Despeje o tampão 2 e adicione outros 100 ml do tampão 2. Incube, sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.
6. Despeje o tampão 2 e adicione 40 ml da solução anticorpo/enzima. Incube, sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.
7. Despeje a solução anticorpo/enzima e adicione 100 ml de tampão 1. Incube, sob agitação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
8. Despeje o tampão 1 e substitua-o por 100 ml de tampão 1 fresco. Incube, sob agitação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Despeje o tampão 1 e adicione 100 ml do tampão 3. Incube, sob agitação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
9. Despeje o tampão 1 e adicione 100 ml do tampão 3. Incube, sob agitação durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
10. Transfira a membrana para um recipiente limpo.
11. Adicione 6 ml da solução de revelação de cor e incube à temperatura ambiente *no escuro* até as bandas começarem a se tornar visíveis (10 minutos a 1 hora). *Certifique-se que a membrana esteja posicionada com o DNA na face superior. Não agite!*
12. Quando o sinal de hibridação atingir uma intensidade aceitável, retire a solução de revelação e adicione 20 ml de tampão TE. Incube, com agitação, à temperatura ambiente por, pelo menos, 30 minutos.
13. Seque a membrana ao ar sobre um pedaço de papel de filtro limpo e guarde-a no escuro.

*Não descarte o tampão de hibridação, cole-o para ser utilizado novamente.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

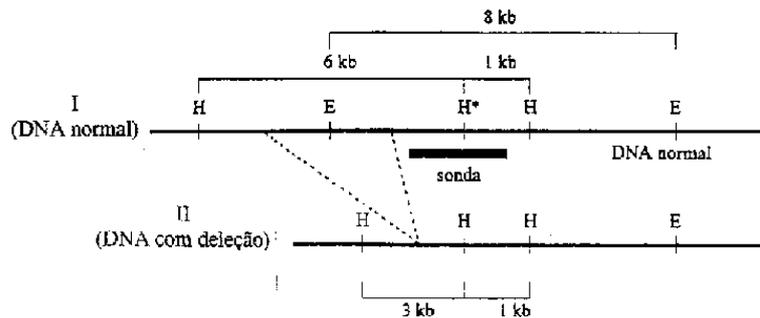
1. Como é possível distinguir-se os sinais produzidos por hibridação não específica daqueles produzidos por digestão parcial do DNA alvo?
2. Que fatores podem influenciar a eficiência de transferência do DNA para a membrana?
3. Porque os fragmentos de DNA do gel devem ser expostos a uma solução alcalina antes da hibridação?
4. Qual é a finalidade do passo de pré-hibridação da membrana?
5. Quais são os fatores que influenciam a hibridação da sonda com a sequência alvo?
6. Quais são as vantagens e desvantagens das sondas radioativas?

EXERCÍCIOS

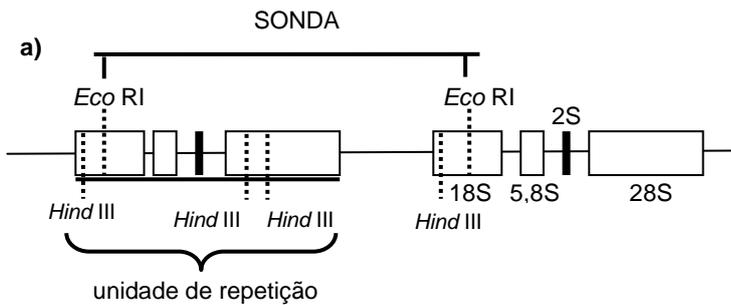
1) O segmento de DNA apresentado no esquema abaixo codifica para uma proteína e foi mapeado com enzimas de restrição. Uma sonda homóloga à região indicada na figura será utilizada para estudar o gene em experimentos de *Southern blotting*. Nesses experimentos, o DNA genômico de um indivíduo normal para o gene foi digerido separadamente com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III. Após a digestão, o DNA foi fracionado em gel de agarose, transferido para uma membrana de náilon e hibridado com a sonda abaixo indicada, marcada com radioatividade. Após a hibridação, a membrana foi coberta com filme de raio-X, exposta durante um período adequado de tempo e o filme foi revelado. Considerando o mapa de restrição abaixo, esquematize no filme de raio-X o padrão de bandas obtido no caso do DNA genômico ter sido digerido:

- Por *Eco* RI.
- Por *Hind* III.
- Por *Eco* RI de um indivíduo em cujo DNA o sítio *Hind* III, marcado com asterisco, foi destruído através de uma mutação de ponto.
- Por *Hind* III de um indivíduo em cujo DNA o sítio *Hind* III, marcado com asterisco, foi destruído através de uma mutação de ponto.
- Por *Eco* RI de um indivíduo com a deleção representada no esquema II.
- Por *Hind* III de um indivíduo com a deleção representada no esquema II.

OBS: A barra preta indica a região genômica utilizada como sonda, correspondente ao trecho acima dela.



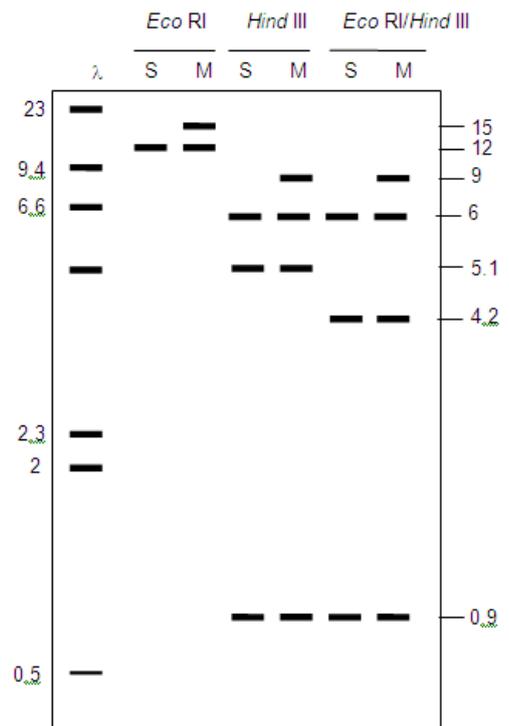
2) O esquema abaixo (à direita) ilustra o resultado da hibridação de uma membrana contendo DNA total de dois tipos de drosófila (selvagem - S e mutante - M). Essas amostras de DNA (S e M) foram inicialmente digeridas com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Hind* III e pela dupla digestão *Eco* RI/ *Hind* III, os fragmentos foram separados por eletroforese e transferidos para uma membrana. Para a hibridação usou-se uma sonda que corresponde a um conjunto de genes ribossômicos de drosófila (esquema à esquerda). Os genes ribossômicos estão organizados em unidades que se repetem em *tandem* centenas de vezes no genoma da drosófila. Os valores dos tamanhos das bandas estão em Kb.



Compare os padrões de bandas encontrados nos DNAs dos dois tipos de drosófila digeridos com a *Eco* RI.

b) Compare os padrões de bandas encontrados nos DNAs dos dois tipos de drosófila digeridos com a *Hind* III.

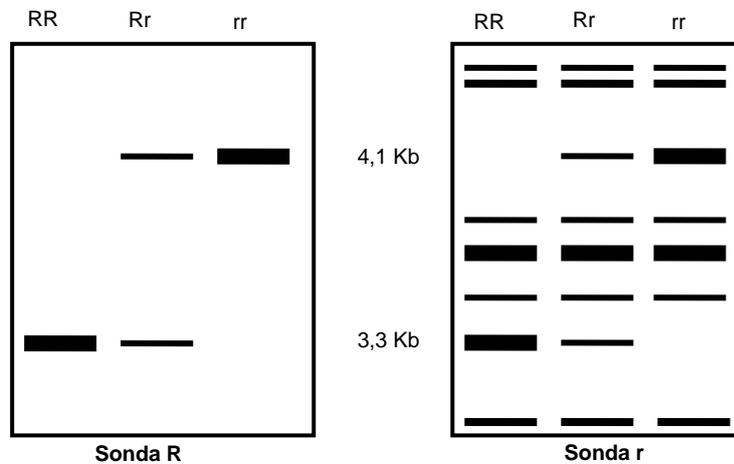
c) Proponha uma hipótese para explicar o padrão de bandas observado. Considere o tamanho dos fragmentos, mutação e complexidade do genoma.



3) A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva causada pela substituição do aminoácido ácido glutâmico (codificado por GAG) por valina (codificado por GTG) na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina. A substituição elimina o sítio de restrição da enzima *Mst* II. Essa enzima corta o DNA de pessoas normais originando um fragmento de 1,1 Kb; nas pessoas com a mutação a enzima gera um fragmento 1,3 Kb.

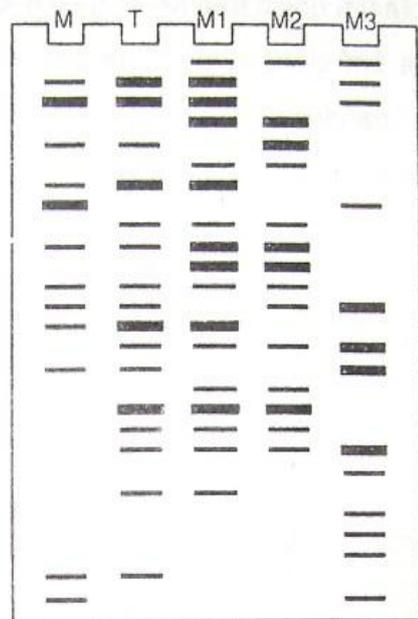
- a) Faça um esquema desta região do gene indicando sítios de restrição nas pessoas normais e nas com a mutação.
 b) Faça um esquema do resultado de uma hibridação com uma sonda específica ao fragmento de 1,1 Kb, na seguinte família: 1) pai heterozigoto; 2) mãe heterozigota; 3) filho afetado; 4) filha afetada; 5) filha heterozigota; 6) filho heterozigoto; 7) filho homozigoto normal.

4) O gene *SBE-I* é sabidamente relacionado ao fenótipo da textura da semente de ervilhas, que pode ser lisa ou rugosa. O alelo para a textura lisa foi isolado a partir do DNA de sementes homozigóticas, assim como o alelo para a textura rugosa. Esses alelos foram utilizados como sonda em experimentos independentes de *Southern blotting*. Amostras de DNA de sementes lisas (RR e Rr) e rugosas (rr) foram digeridas com uma enzima de restrição apropriada que mantém o gene *SBE-I* intacto e os fragmentos foram fracionados por eletroforese. Dois géis idênticos foram feitos e o DNA transferido para uma membrana. Cada membrana foi hibridada separadamente com uma sonda diferente. A primeira sonda corresponde ao DNA do alelo R e a segunda sonda, ao DNA do alelo r. Os resultados obtidos após a hibridação estão esquematizados abaixo.

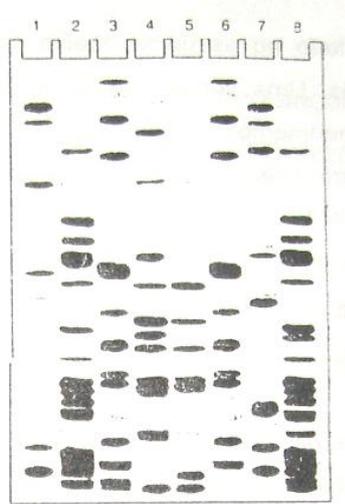


- a) Observe os resultados e proponha uma hipótese consistente com as suas observações.
 b) Como os resultados obtidos com a sonda r podem ser usados para corroborar a sua hipótese? Justifique.

5) Um zoológico adquiriu uma fêmea de tigre para seu programa de reprodução em cativeiro. Apesar da identidade da mãe dessa fêmea ser conhecida, havia dúvida sobre seu pai e, portanto, alguns dos machos potenciais para serem usados no cruzamento poderiam ser muito aparentados a ela. Foi realizado, então, o exame do DNA dessa tigresa, de sua mãe e de três machos, com o objetivo de se evitar excessiva consanguinidade no cruzamento. Os resultados da análise usando uma sonda de minissatélite estão mostrados na figura ao lado, onde M = mãe; T = tigresa; M1-3 = machos potenciais para os cruzamentos. Qual dos três machos seria o mais adequado para ser cruzado com a tigresa? Justifique sua resposta.

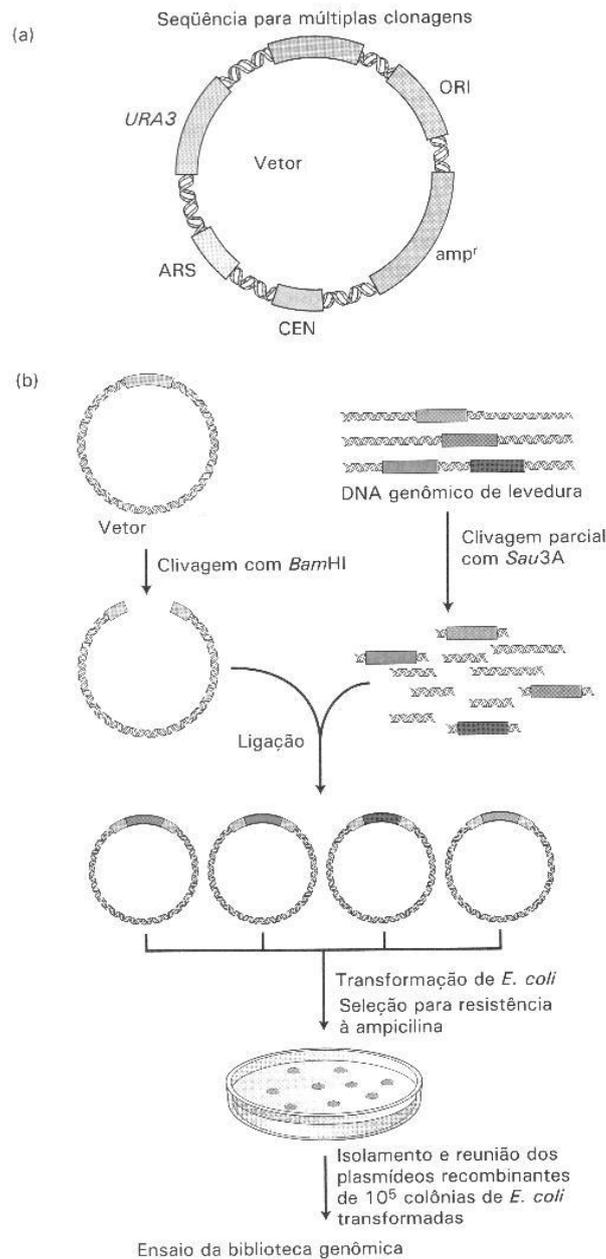


6) Quatro pares de gêmeos, nascidos no espaço de uma hora, foram trocados em uma maternidade. Você foi chamado para resolver o problema. Como um primeiro passo, você deseja identificar os pares de gêmeos. Para isso analisou o sangue de cada criança usando uma sonda que identifica polimorfismos de VNTR. Com base nos resultados mostrados na figura, responda quais crianças são irmãs e como você irá identificar os pais corretos.



UNIDADE 10

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE



Pierce, B. A. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. GUANABARA-KOOGAN, Rio de Janeiro, 1^a edição, 2004. Pág. 498-508; 535-538

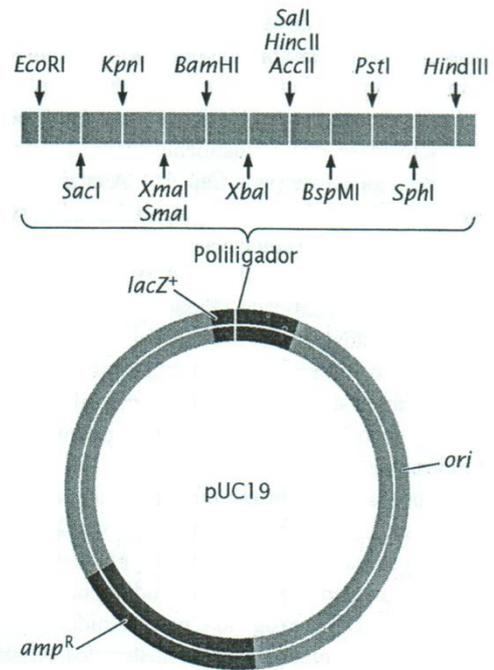


Fig. 18.7 O plasmídeo pUC19 é um típico vetor de clonagem. Ele contém um grupo de sítios únicos de restrição, uma origem de replicação, e dois marcadores selecionáveis, um gene de resistência à ampicilina e um gene *lacZ*.

Clonagem de Genes

Muitos métodos de DNA recombinante necessitam de numerosas cópias de um fragmento específico de DNA. Um modo de se obter essas cópias é colocar o fragmento em uma bactéria e deixar que ela replique o DNA. Esse procedimento é chamado de **clonagem gênica**, porque são produzidas cópias idênticas (clones) do trecho original do DNA.

Vetores de clonagem Um **vetor de clonagem** é uma molécula de DNA estável, replicante, à qual um fragmento de DNA exógeno pode ser ligado para introdução em uma célula. Um vetor efetivo de clonagem tem três características importantes (Fig. 18.6): (1) uma origem de replicação, que garante que o vetor se replique dentro da célula; (2) marcadores selecionáveis, que permitem que todas as células que contenham o vetor sejam selecionadas ou identificadas; e (3) um ou mais sítios únicos de restrição nos quais um fragmento de DNA possa ser inserido. Os sítios de restrição usados para clonagem devem ser únicos. Se um vetor é cortado em vários sítios de reconhecimento, gerando vários trechos de DNA, não haverá meio de se juntar os trechos

na ordem correta. São usados três tipos de vetores de clonagem para clonar genes em bactérias: plasmídeos, bacteriófagos e cosmídeos.

Vetores plasmidiais Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA que existem naturalmente em bactérias (veja Cap. 8). Eles contêm origens de replicação e são portanto capazes de se replicar independentemente do cromossomo bacteriano. Os plasmídeos usados tipicamente em clonagem foram construídos a partir de outros maiores, que ocorrem naturalmente em bactérias.

O plasmídeo pUC19 é um típico vetor de clonagem (Fig. 18.7). Ele tem uma origem de replicação e dois marcadores

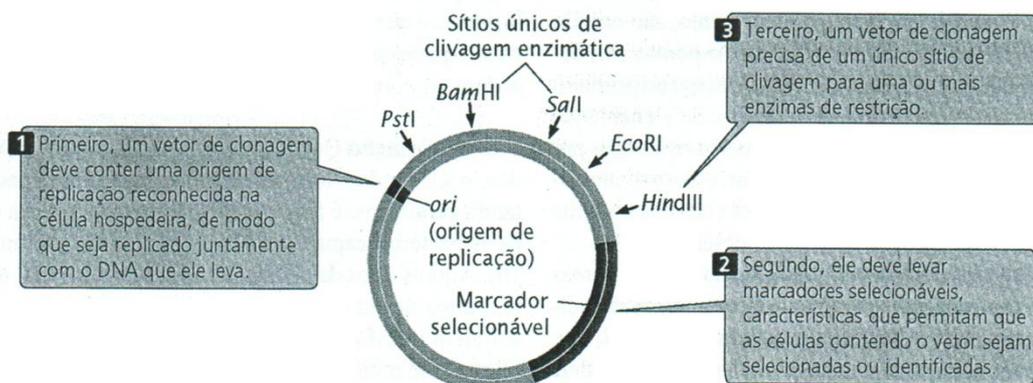


Fig. 18.6 Três características de um vetor de clonagem idealizado. Uma origem de replicação, um ou mais marcadores selecionáveis e um ou mais sítios únicos de restrição.

selecionáveis — um gene de resistência à ampicilina e um gene *lacZ*. A ampicilina é um antibiótico que normalmente mata as bactérias, mas qualquer bactéria que contenha um plasmídeo pUC19 será resistente a esse antibiótico. O gene *lacZ* codifica a enzima β -galactosidase, que normalmente quebra a lactose para produzir glicose e galactose (veja Cap. 16). A enzima também quebrará uma substância chamada X-gal, produzindo uma substância azul. Quando X-gal é colocada no meio, qualquer colônia de bactérias que contenha plasmídeos pUC19 intactos ficará azul e pode ser facilmente identificada. (Nesses experimentos, o próprio gene de β -galactosidase da bactéria foi inativado, e assim só as bactérias com o plasmídeo ficam azul.) O plasmídeo pUC19 também possui vários sítios de restrição únicos agrupados (um poliligador) que permitem que fragmentos de DNA sejam inseridos no plasmídeo.

O método mais fácil para inserir um fragmento de DNA exógeno em um plasmídeo é usar a clonagem de restrição, na qual o DNA exógeno e o plasmídeo são cortados pela mesma enzima de restrição. A clonagem de restrição produz pontas adesivas complementares no DNA exógeno e no plasmídeo (FIGURA 18.8a). O DNA e o plasmídeo são então misturados. Alguns dos fragmentos exógenos de DNA irão parear com as pontas cortadas do plasmídeo. A DNA ligase fecha os cortes na seqüência açúcar-fosfato, criando um plasmídeo recombinante que contém o fragmento de DNA exógeno.

Transformação Quando um gene foi colocado em um plasmídeo, o plasmídeo deve ser introduzido em uma bactéria. Essa tarefa geralmente é feita por *transformação*, que é a capacidade de as bactérias captarem DNA do ambiente externo (veja Cap. 10). Alguns tipos de células sofrem transformação naturalmente; outros devem ser tratados química ou fisicamente antes de sofrerem transformação. Dentro da célula, os plasmídeos se replicam e se multiplicam.

O uso de marcadores seletivos As células portadoras de plasmídeos recombinantes podem ser detectadas usando mar-

Observações:

Pontas adesivas = pontas coesivas

(a) Clonagem de restrição

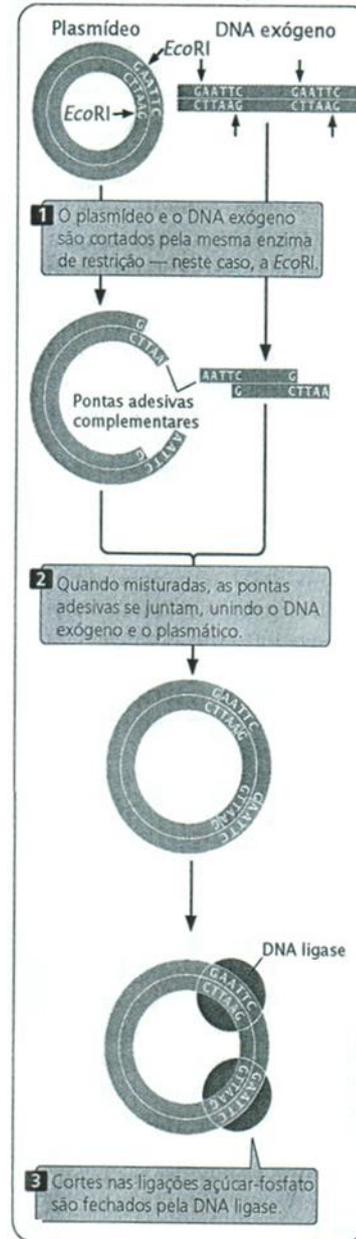


Fig. 18.8 Um fragmento exógeno de DNA pode ser inserido em um plasmídeo com o uso de (a) clonagem de restrição, (b) ramificação ou (c) ligadores.

cadores selecionáveis no plasmídeo. Um tipo de marcador selecionável comumente usado em plasmídeos é uma cópia do gene *lacZ* (FIGURA 18.9). O gene *lacZ* contém uma série de sítios únicos de restrição nos quais pode ser inserido um fragmento de DNA a ser clonado. Na ausência de um fragmento inserido, o gene *lacZ* é ativo e produz β -galactosidase. Quando o DNA exógeno é inserido no sítio de restrição, ele perturba o gene *lacZ*, e a β -galactosidase não é produzida. O plasmídeo em ge-

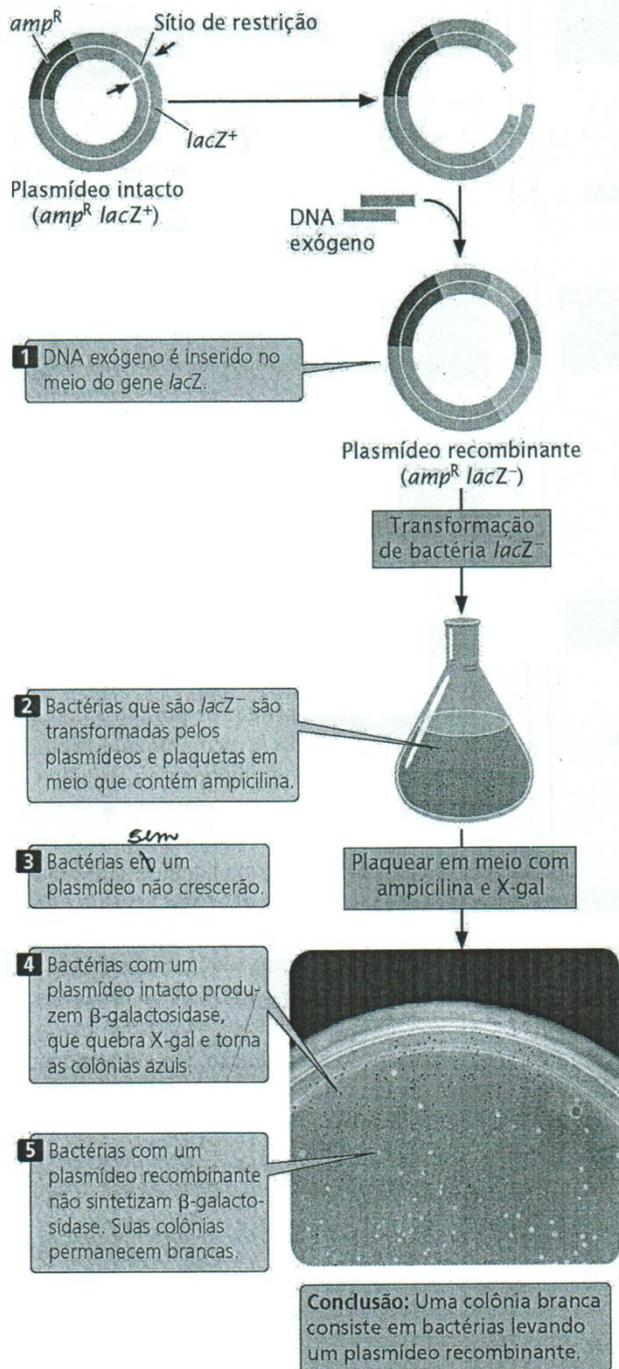


Fig. 18.9 O gene *lacZ* pode ser usado para triar bactérias contendo plasmídeos recombinantes. Um plasmídeo especial leva uma cópia do gene *lacZ* e um gene de resistência à ampicilina. (Foto: Cytographic/Visuals Unlimited.)

ral também contém um segundo marcador selecionável, que pode ser um gene que confere resistência a um antibiótico tal como a ampicilina.

As bactérias que são *lacZ*⁻ são transformadas pelos plasmídeos e plaqueadas em meio que contém ampicilina. Apenas as células que foram transformadas com êxito e contêm um plasmídeo com o gene de resistência à ampicilina sobreviverão e crescerão. Algumas dessas células conterão um plasmídeo intacto, enquanto outras possuem um plasmídeo recombinante. O meio também contém a substância química X-gal. As bactérias com um plasmídeo original intacto, sem o fragmento inserido, têm um gene funcional *lacZ* e podem sintetizar β -galactosidase, que quebra X-gal e torna a bactéria azul. As bactérias com um plasmídeo recombinante, entretanto, têm um gene de β -galactosidase que é perturbado pelo DNA inserido; elas não sintetizam β -galactosidase e permanecem brancas. Assim, a cor da colônia permite a rápida determinação de se um plasmídeo recombinante ou um intacto está presente na célula.

Os plasmídeos constituem vetores ideais de clonagem, mas podem conter apenas DNA com menos de cerca de 15 kb de tamanho. Quando grandes fragmentos de DNA são inseridos em um vetor plasmidial, o plasmídeo torna-se instável. A clonagem de fragmentos de DNA que são maiores que 15 kb requer o uso de vetores de clonagem diferentes.

Conceitos

Os fragmentos de DNA podem ser inseridos em vetores de clonagem, trechos estáveis de DNA que irão se replicar dentro da célula. Os vetores de clonagem devem ter uma origem de replicação, um ou mais sítios únicos de restrição e marcadores selecionáveis. Os plasmídeos são comumente usados como vetores de clonagem.

Bacteriófagos vetores Os bacteriófagos oferecem várias vantagens como vetores de clonagem. O bacteriófago vetor mais amplamente usado é o bacteriófago λ , que infecta *E. coli*. Uma de suas principais vantagens é a alta eficiência com a qual transfere DNA para uma bactéria. Uma segunda vantagem é que cerca de um terço do genoma de λ não é essencial para a infecção e a reprodução. Sem esses genes, uma partícula λ ainda injeta seu DNA em uma bactéria e se reproduz. Esses genes não-essenciais, que têm cerca de 15 kb, podem ser substituídos por até cerca de 23 kb de DNA exógeno. Uma terceira vantagem é que o DNA não será compactado em uma capa de λ a menos que tenha de 40 a 50 kb de tamanho. Assim, os fragmentos de DNA exógeno não são sujeitos a serem transferidos pelo vetor, a menos que sejam inseridos no genoma de λ , o que garante que o fragmento de DNA exógeno seja replicado após entrar na célula.

Os genes essenciais do genoma do fago λ estão situados em um grupo. As linhagens de fago λ , chamadas de vetores de substituição, foram alteradas com sítios únicos de *EcoRI* em ambos os lados de genes não-essenciais (FIGURA 18.10) de modo que, usando *EcoRI*, os genes não-essenciais podem ser removidos. O DNA exógeno cortado com *EcoRI* terá pontas adesivas que são complementares às pontas de genes essenciais de λ , aos quais podem ser unidos pela ligase. O cromossomo de λ pos-

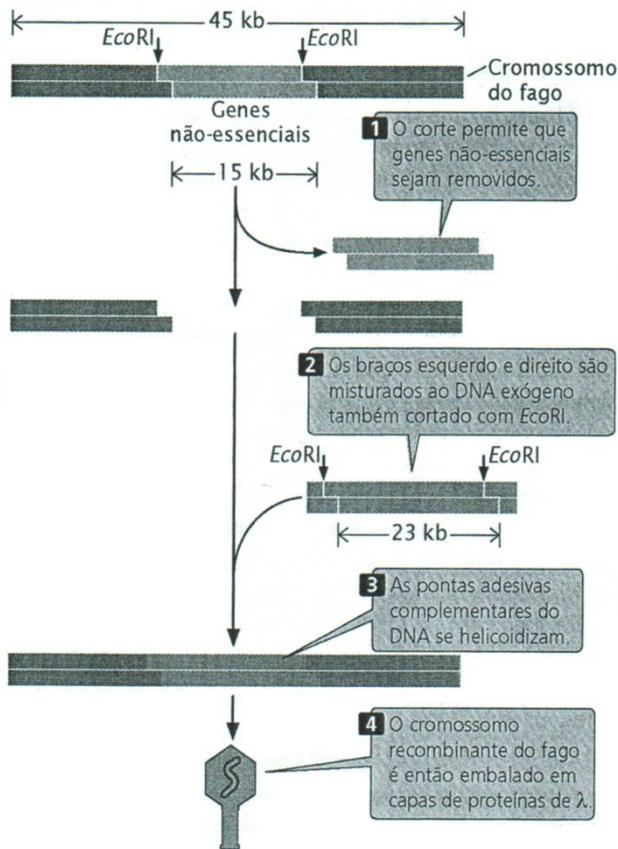


Fig. 18.10 O fago λ é um efetivo vetor de clonagem.

sua ponta curta unifilamentar chamada sítio *cos* que são necessários para embalar o DNA de λ na cabeça de um fago. Os cromossomos do fago recombinante podem então ser embalados em capas protéicas e adicionados à *E. coli*. Os fagos injetam seu DNA recombinante na célula, onde será replicado. Apenas os fragmentos de DNA do tamanho apropriado e contendo genes essenciais serão embalados nas capas dos fagos, dando um sistema automático de seleção para vetores recombinantes.

Cosmídeos vetores Embora apenas cerca de 23 kb de DNA possam ser clonados em vetores λ , os fragmentos de DNA tão grandes quanto 44 kb podem ser clonados em cosmídeos, os quais combinam as propriedades dos plasmídeos e fagos vetores.

Os **cosmídeos** são pequenos plasmídeos que elevam sítios *cos* de fago λ . Eles podem ser embalados em capas virais e transferidos para bactérias por infecção viral. Como todos os genes virais exceto os sítios *cos* estão faltando, um cosmídeo pode levar mais que o dobro de DNA que um fago vetor. Os cosmídeos vetores têm os seguintes componentes: (1) uma origem plasmidial de replicação (*ori*); (2) um ou mais sítios únicos de restrição; (3) um ou mais marcadores selecionáveis; e (4) sítios *cos* para permitir a embalagem do DNA nas cabeças dos fagos.

O DNA exógeno é inserido em cosmídeos do mesmo modo que o DNA é introduzido nos plasmídeos: o cosmídeo e o DNA exógeno são ambos cortados por uma enzima de restrição que produz pontas complementares (adesivas) e são unidos pela DNA ligase. Os cosmídeos recombinantes são incorporados nas capas, e as partículas de fago são usadas para infectar bactérias, onde o cosmídeo se replica como um plasmídeo. O Quadro 18.3 compara as propriedades dos plasmídeos, vetores de fago λ e cosmídeos.

Conceitos

Os bacteriófagos vetores não só abrigam mais DNA que os plasmídeos mas também transferem DNA exógeno para as células bacterianas a uma taxa relativamente alta. Um cosmídeo vetor consiste em um plasmídeo com sítios *cos*, o que permite que o DNA seja compactado em capas de proteína do fago. Os cosmídeos abrigam mais DNA que os bacteriófagos vetores.

Vetores de expressão Às vezes a meta na clonagem gênica não é apenas replicar o gene, mas também produzir a proteína que ele codifica. Um dos primeiros produtos comerciais criados pela tecnologia do DNA recombinante foi a proteína insulina. O gene para insulina humana foi isolado e inserido em bactérias, que foram então multiplicadas e usadas para sintetizar insulina humana. Entretanto, a expressão bem-sucedida de um gene humano em uma bactéria não é direta. Embora a universalidade do código genético permita que genes humanos especifiquem a mesma proteína tanto em células humanas quanto em bactérias, as seqüências que regulam a transcrição e a tradução são bem diferentes nas bactérias e eucariontes.

Para garantir a transcrição e a tradução, um gene exógeno é geralmente inserido em um **vetor de expressão**, que, em adição à origem usual de replicação, sítios de restrição e marcadores

Quadro 18.3 Comparação de plasmídeos, vetores de fago lambda e cosmídeos

Vetor de Clonagem	Tamanho do DNA que Pode Ser Clonado	Método de Propagação	Introdução nas Bactérias
Plasmídeo	Tão grande quanto 15 kb	Replicação do plasmídeo	Transformação
Fago lambda	Tão grande quanto 23 kb	Reprodução do fago	Infecção pelo fago
Cosmídeo	Tão grande quanto 44 kb	Reprodução do plasmídeo	Infecção pelo fago

Nota: 1 kb = 1.000 pb.

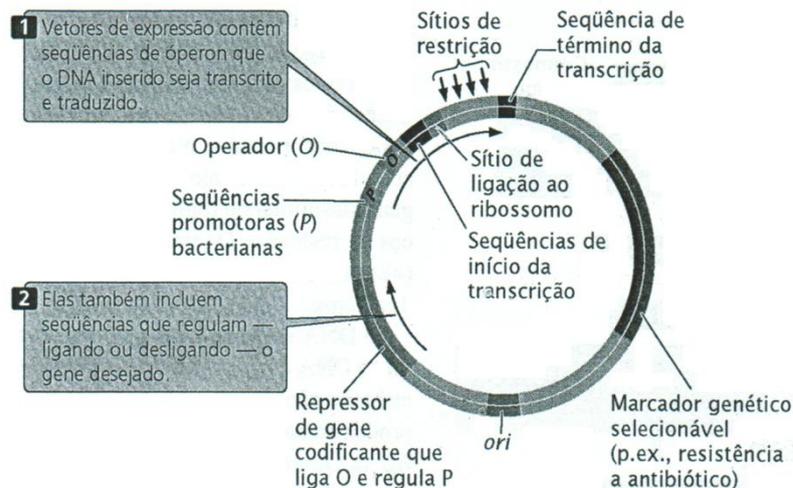


Fig. 18.11 Para garantir a transcrição e tradução, um gene exógeno deve ser inserido em um vetor de expressão — neste exemplo, um vetor de expressão de *E. coli*.

selecionáveis, contém seqüências necessárias para a transcrição e tradução em bactérias (FIGURA 18.11). Essas seqüências adicionais devem incluir:

1. Um promotor bacteriano, tal como o promotor *lac*. O promotor precede o sítio de restrição onde o DNA exógeno deve ser inserido, permitindo que a transcrição da seqüência exógena seja regulada adicionando substâncias que induzem o promotor.
2. Uma seqüência de DNA que, quando transcrita em RNA, produz um sítio de ligação ribossômico bacteriano.
3. Sequências de início e término de transcrição bacteriana.
4. Sequências que controlam o início da transcrição, tais como genes reguladores e operadores.

O promotor bacteriano e o sítio de ligação ribossômico estão geralmente situados antecedendo o sítio de restrição, o que permite que o DNA exógeno seja inserido em seguida ao códon de iniciação. Quando o plasmídeo é colocado em uma bactéria, a RNA polimerase liga-se ao promotor e transcreve o DNA exógeno. Os ribossomos bacterianos unem-se ao sítio de ligação do ribossomo no RNA e traduzem a seqüência em uma proteína exógena.

Conceitos

Um vetor de expressão contém um promotor, um sítio de ligação do ribossomo e outras seqüências que permitem que o gene clonado seja transcrito e traduzido em bactérias.

Vetores de clonagem para eucariontes Os vetores discutidos até agora permitem que os genes sejam clonados em bactérias. Outros vetores de clonagem foram desenvolvidos para transferência de genes para células eucarióticas. Plasmídeos especiais, por exemplo, foram desenvolvidos para clonagem em leveduras, e vetores retrovirais foram desenvolvidos para clonagem em mamíferos.

Vetores de transporte são usados para levar genes indo e vindo entre dois hospedeiros. Por exemplo, os plasmídeos foram produzidos para permitir que seqüências gênicas sejam clonadas e manipuladas em bactérias e então transferidas para células de leveduras para estudo. Por esses motivos, eles devem conter origens de replicação e marcadores selecionáveis que funcionam em ambos os hospedeiros.

Cromossomos artificiais de levedura (YACs) são moléculas de DNA com uma origem de replicação de levedura, um par de telômeros e um centrômero. As fibras do fuso mitótico ligam-se ao centrômero, e os YACs se segregam do mesmo modo que os cromossomos de leveduras. Os telômeros garantem que os YACs permaneçam estáveis na célula, e a origem de replicação permite que os YACs sejam replicados. Os YACs são particularmente úteis porque podem levar fragmentos de DNA com até 600 kb, e alguns YACs especiais podem levar inserções de mais de 1.000 kb. Os YACs foram modificados de modo a poderem ser usados em outros organismos eucarióticos que não leveduras (veja a introdução no Cap. 11). Os **cromossomos artificiais bacterianos (BACs)**, construídos a partir de fatores F (veja Cap. 8), são usados para clonar grandes fragmentos que variam de tamanho de 100 a 500 kb em bactérias.

A bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens*, que invade plantas através de feridas e induz o tumor de galha, foi usada para transferir genes para plantas. Essa bactéria contém um grande plasmídeo chamado **plasmídeo Ti**, parte do qual é transferida para uma célula vegetal quando a *A. tumefaciens* infecta uma planta. Na planta, o DNA do plasmídeo Ti se integra a um dos cromossomos da planta, onde ele é transcrito e traduzido para produzir várias enzimas que ajudam a sustentar a bactéria (FIGURA 18.12a). A transferência do segmento de DNA do plasmídeo Ti para um cromossomo da planta requer duas seqüências de 25 pb flanqueadoras do DNA Ti, bem como vários genes situados no plasmídeo Ti.

Os geneticistas construíram um vetor de transporte *Agrobacterium* — *E. coli* que contém as seqüências flanqueadoras necessárias para transferir o DNA, um marcador selecionável, e

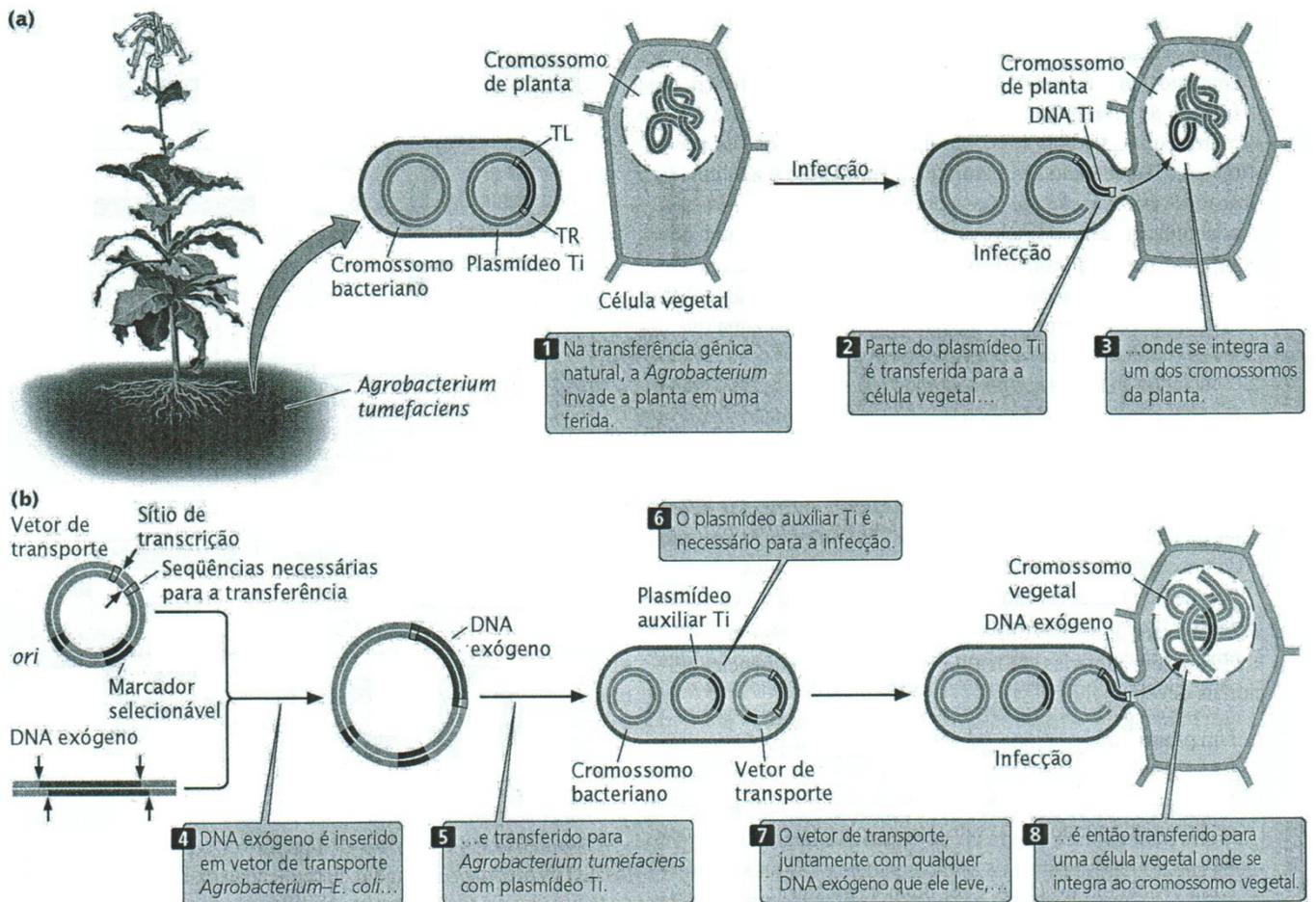


Fig. 18.12 O plasmídeo Ti pode ser usado para transferir genes para plantas.

sítios de restrição nos quais pode ser inserido o DNA exógeno (FIGURA 18.12b). Quando colocado em uma *A. tumefaciens* com o plasmídeo Ti, o vetor de transporte irá transferir o DNA exógeno que ele leva para uma célula vegetal, onde irá se integrar a um cromossomo da planta. Esse vetor tem sido usado para transferir genes que conferem atributos econômicos significativos, tais como resistência a herbicidas, vírus de plantas e pestes de insetos.

Conceitos

São usados vetores especiais para introduzir genes em eucariontes. Eles incluem vetores de transporte, que podem se reproduzir em dois hospedeiros diferentes, leveduras e cromossomos artificiais de bactérias, que possuem fragmentos de DNA com milhares de pares de bases de tamanho, e o plasmídeo Ti, que transfere genes para plantas.

Localização de Genes

Em nossa consideração sobre clonagem gênica, nos deparamos com um problema de grande significado: Como encontrar seqüências de DNA a serem clonadas? De fato, esse problema é

frequentemente o mais significativo na clonagem, pois existem em geral milhões ou bilhões de pares de bases de DNA em uma célula. Uma discussão sobre como resolver esse problema foi adiada para agora porque, paradoxalmente, primeiro temos que clonar um gene para encontrá-lo.

Este enfoque — clonar primeiro e depois encontrar — é chamado de “clonagem de espingarda de caça (*shotgun*)”, porque é como caçar com uma arma que dispare pequenos chumbinhos: o tiro dispara os chumbinhos em uma ampla direção, sabendo que há uma boa chance de que um ou mais deles atinjam o alvo pretendido. Na clonagem de espingarda de caça, primeiro clonamos um grande número de fragmentos de DNA, sabendo que um ou mais contém o DNA de interesse, e então procuramos o fragmento de interesse entre os clones.

Uma coleção de clones contendo todos os fragmentos de DNA de uma fonte é chamada de **biblioteca de DNA**. Por exemplo, podemos isolar o DNA genômico de células humanas, quebrá-lo em fragmentos, e clonar todos eles em bactérias ou fagos. O conjunto de colônias ou fagos contendo esses fragmentos é uma **biblioteca genômica humana**, contendo todas as seqüências de DNA encontradas no genoma humano.

Criação de uma biblioteca genômica Para criar uma biblioteca genômica, as células são coletadas e rompidas, o que faz com que liberem seu DNA e outros conteúdos celulares em uma solução aquosa. Existem vários métodos para isolar o DNA de outros conteúdos celulares. Em um método, o fenol (um solvente orgânico que não se mistura bem com água) é adicionado à mistura, que é então agitada. As proteínas da célula se associam ao fenol, enquanto o DNA e o RNA permanecem no meio aquoso, que é removido com o uso de uma pipeta. Os ácidos nucleicos são então precipitados dessa solução pela adição de álcool frio. O RNA pode ser removido pela adição de uma enzima que degrada o RNA mas não o DNA.

Quando o DNA tiver sido extraído, ele é cortado em fragmentos com o uso de uma enzima de restrição para digeri-lo por um tempo limitado (uma digestão parcial), de modo que apenas *alguns* dos sítios de restrição em cada molécula de DNA sejam cortados. Como o corte dos sítios é aleatório, moléculas diferentes de DNA serão cortadas em locais diferentes, e será produzido um conjunto de fragmentos superpostos (FIGURA 18.13). Os fragmentos são então unidos ao plasmídeo, fago ou cosmídeos vetores, que podem ser transferidos para bactérias. Essa técnica produz um conjunto de bactérias ou partículas de fago contendo os fragmentos genômicos superpostos. Alguns dos clones contêm todo o gene de interesse, alguns contêm parte do gene, mas a maioria conterá fragmentos que não têm parte do gene de interesse.

Uma biblioteca genômica deve conter um grande número de clones para garantir que todas as seqüências de DNA no genoma sejam representadas na biblioteca. Uma biblioteca genômica humana formada usando cosmídeos, cada um levando um fragmento de DNA de 35.000 a 44.000 pb de tamanho, necessitaria de cerca de 350.000 clones cosmídicos para fornecer uma chance de 99% de que todas as seqüências sejam incluídas na biblioteca.

Criando uma biblioteca de cDNA Uma alternativa para criar uma biblioteca genômica é criar uma biblioteca consistindo apenas nas seqüências de DNA que são transcritas em mRNA (chamada uma **biblioteca de cDNA**, pois todo o DNA nessa biblioteca é *complementar* ao mRNA). Grande parte do DNA eucariótico consiste em seqüências repetitivas (e outro DNA) que não são transcritas em mRNA (veja Cap. 11), e em seqüências que não são representadas na biblioteca de cDNA.

Uma biblioteca de cDNA tem duas vantagens adicionais. Primeira, ela é enriquecida de fragmentos de genes ativamente transcritos. Segunda, os íntrons não interrompem as seqüências clonadas. Os íntrons criariam um problema quando a meta é produzir uma proteína eucariótica em bactérias, pois a maioria das bactérias não tem meios para remover os íntrons.

A desvantagem de uma biblioteca de cDNA é que ela contém apenas seqüências que estão presentes no mRNA final. Os íntrons e outras seqüências que são alteradas após a transcrição não estão presentes. Seqüências, tais como promotores e acentuadores, que não são transcritas em RNA também não estão presentes em uma biblioteca de cDNA. Também é importante notar que a biblioteca de cDNA representa apenas as seqüências de genes expressos no tecido do qual o RNA foi isolado. Além disso, a

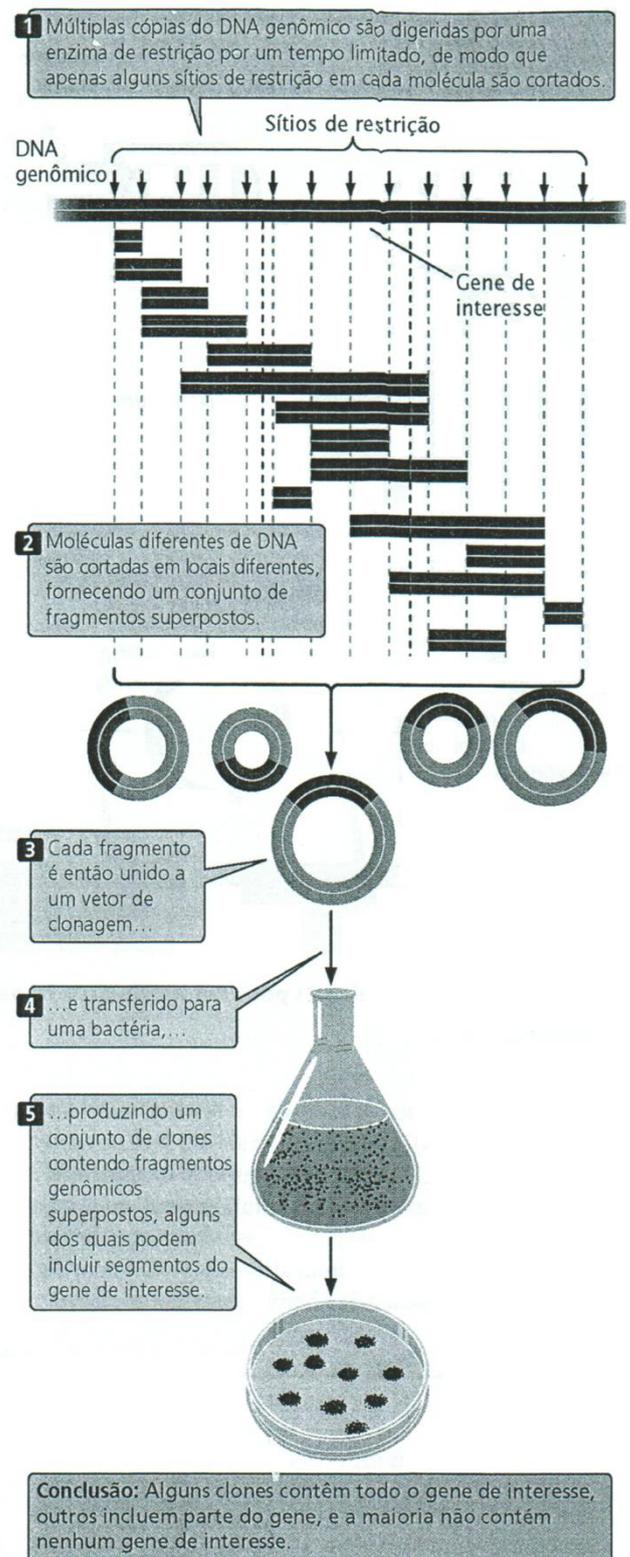


Fig. 18.13 Uma biblioteca genômica contém todas as seqüências de DNA encontradas no genoma de um organismo.

frequência de uma determinada seqüência de DNA em uma biblioteca de cDNA depende da abundância do mRNA correspondente em um determinado tecido. Em contraste, quase todos os

genes estão presentes na mesma frequência em uma biblioteca de DNA genômico.

Para criar uma biblioteca de cDNA, o RNA mensageiro deve primeiro ser separado de outros tipos de RNA celular (tRNA, rRNA, snRNA, etc.). A maioria dos mRNAs eucarióticos possui uma sequência de nucleotídeos adenina na ponta 3', e esta cauda poli(A) fornece uma maneira para distinguir o mRNA eucariótico de outros tipos. O RNA celular total é isolado das células e passado por uma coluna cheia de fragmentos curtos de DNA consistindo inteiramente em nucleotídeos timina [cadeias oligo(dT); FIGURA 18.14a]. À medida que o RNA se move pela coluna, as caudas poli(A) das moléculas de mRNA fazem par com as cadeias oligo(dT) e são retidas na coluna, enquanto o resto do RNA atravessa. O mRNA pode então ser removido da coluna com a adição de um tampão que rompe as

pontes de hidrogênio entre as caudas poli(A) e as cadeias oligo(dT).

As moléculas de mRNA são então copiadas em cDNA por transcrição reversa. São adicionados *primers* curtos de oligo(dT) ao mRNA. Um *primer* faz par com a cauda poli(A) na ponta 3' do mRNA, dando um grupo 3'-OH para a iniciação da síntese de DNA (FIGURA 18.14b). A transcriptase reversa, uma enzima isolada de retrovírus (veja no Cap. 8), sintetiza um DNA unifilar complementar a partir do molde de RNA adicionando nucleotídeos de DNA ao grupo 3'-OH do *primer*.

A molécula híbrida RNA-DNA resultante é então convertida em uma molécula bifilar de cDNA por um de vários métodos. Um método comum é tratar o híbrido RNA-DNA com RNase para digerir parcialmente o filamento de RNA. A digestão parcial deixa espaços no híbrido RNA-DNA, permitindo que

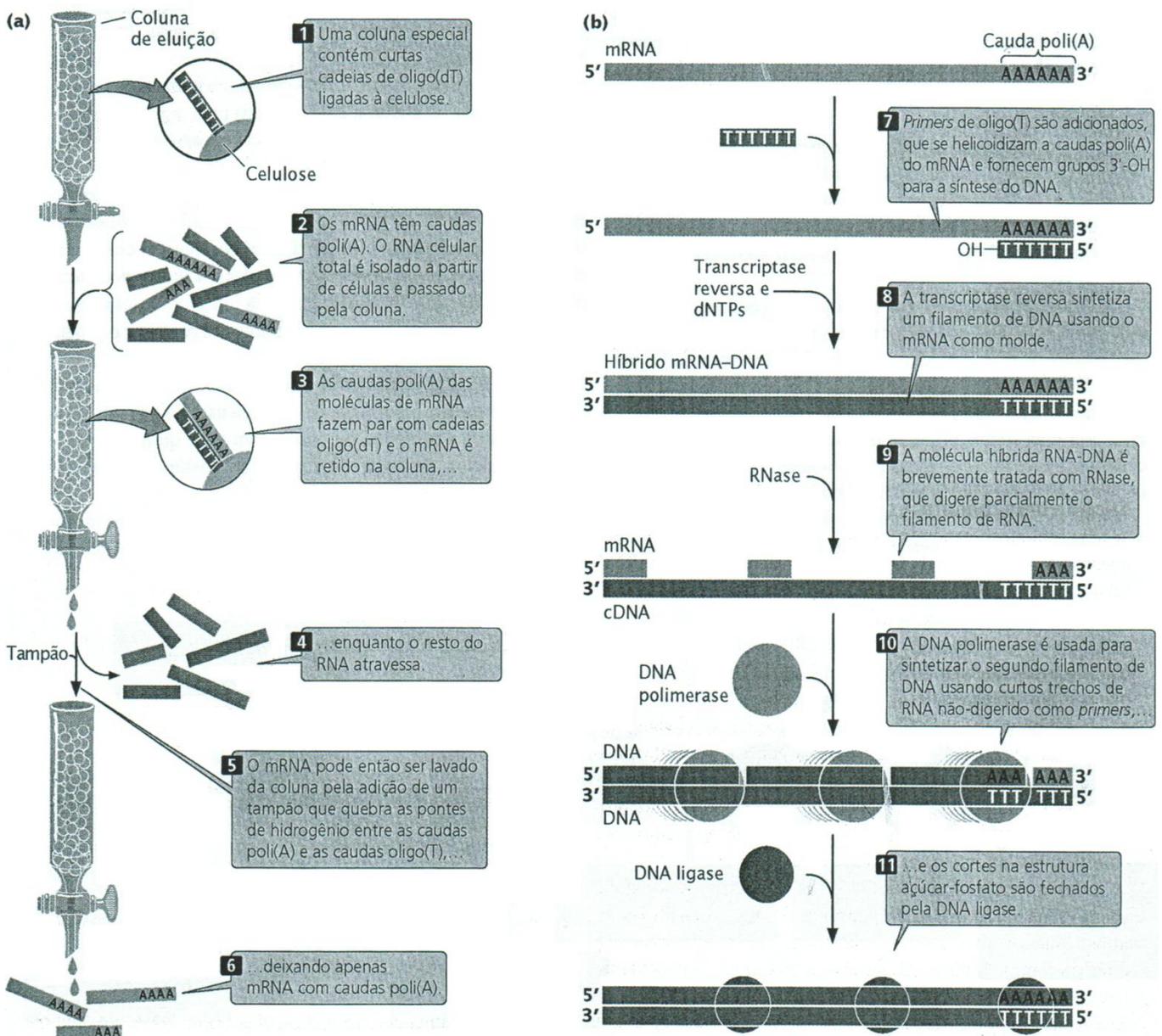


Fig. 18.14 Uma biblioteca de cDNA contém apenas as seqüências de DNA que são transcritas em mRNA.

a DNA polimerase sintetize um segundo filamento de DNA usando trechos curtos não-digeridos de RNA como *primers* e o primeiro filamento de DNA como molde. A DNA polimerase acaba por deslocar todos os fragmentos de RNA, substituindo-os com nucleotídeos de DNA, e os cortes na seqüência açúcar-fosfato são fechados pela DNA ligase.

Conceitos

Um método para encontrar o gene é criar e triar uma biblioteca de DNA. Uma biblioteca genômica é criada cortando o DNA genômico em fragmentos superpostos e clonando cada fragmento em uma bactéria separada. Uma biblioteca de cDNA é criada a partir do mRNA que é convertido em cDNA e clonado em bactérias.

Triagem de bibliotecas de DNA A criação de uma biblioteca genômica ou de cDNA é relativamente fácil em comparação com a triagem da biblioteca para encontrar clones que contenham o gene de interesse. O procedimento de triagem usado depende do que se sabe sobre o gene.

A primeira etapa na triagem é obter os clones da biblioteca. Se for usado um plasmídeo ou vetor cosmidial para construir a biblioteca, as células são diluídas e plaqueadas de modo que cada bactéria cresça em uma colônia distinta. Se for usado um fago como vetor, os fagos infectam uma camada de bactérias em uma placa de Petri. Cada placa ou colônia bacteriana contém um único fragmento de DNA clonado que deve ser triado quanto ao gene de interesse.

Um modo comum para triar bibliotecas é com sondas. Já vimos como as sondas podem ser usadas para encontrar fragmentos específicos de DNA em um gel de eletroforese (veja Figura 18.5). De um modo similar, as sondas podem ser usadas para encontrar fragmentos clonados de DNA em bactérias ou fagos. Para usar uma sonda, primeiro devem ser feitas as réplicas das colônias plaqueadas ou placas na biblioteca. A **FIGURA 18.15** ilustra esse procedimento para uma biblioteca de cosmídeo.

Como uma sonda é obtida quando o gene ainda não foi isolado? Uma opção é usar um gene similar de outro organismo como

sonda. Por exemplo, se desejamos triar uma biblioteca genômica humana quanto ao gene do hormônio de crescimento e o gene já foi isolado de ratos, podemos usar uma seqüência purificada de gene de rato como sonda para encontrar o gene humano de hormônio de crescimento. A hibridização bem-sucedida não requer a perfeita complementaridade entre a sonda e a seqüência alvo. Assim, uma seqüência correlata pode em geral ser usada como sonda. A temperatura e a concentração de sal da reação de hibridização podem ser ajustadas para regular o grau de complementaridade necessário para que ocorra o pareamento. Alternativamente, podem ser criadas sondas sintéticas se a proteína produzida pelo gene já foi isolada e sua seqüência de aminoácidos já foi determinada. Com o uso do código genético e a seqüência de aminoácidos da proteína, podem ser deduzidas as possíveis seqüências de nucleotídeos de uma pequena região do gene. Embora apenas uma seqüência do gene codifique uma determinada proteína, a presença de códons sinônimos significa que a mesma proteína pode ser produzida por várias seqüências diferentes de DNA, e é impossível saber qual é a correta. Para superar esse problema, é usada como sonda uma mistura de todas as seqüências possíveis de DNA. Para diminuir o número de seqüências necessárias na mistura, é selecionada uma região da proteína com relativamente pouca redundância em seus códons (**FIGURA 18.16**).

Quando parte da seqüência do DNA do gene foi determinada, um grupo de sondas do DNA pode ser sintetizado quimicamente usando uma máquina automatizada conhecida como um sintetizador de oligonucleotídeos. As sondas resultantes podem ser usadas para triar uma biblioteca quanto a um gene de interesse.

Um outro método de triar uma biblioteca é procurar o produto protéico de um gene. Esse método requer que a biblioteca de DNA seja clonada em um vetor de expressão. Os clones podem ser testados quanto à presença da proteína usando um anticorpo que reconheça a proteína, ou usando um teste químico para o produto protéico. Esse método depende da existência de um teste para a proteína produzida pelo gene.

Quase todos os métodos usados para triar uma biblioteca identificarão vários clones, alguns dos quais serão falso-positivos que não



Fig. 18.15 As bibliotecas genômicas e de cDNA podem ser triadas com uma sonda para encontrar o gene de interesse.

Parte conhecida da
seqüência de aminoácidos

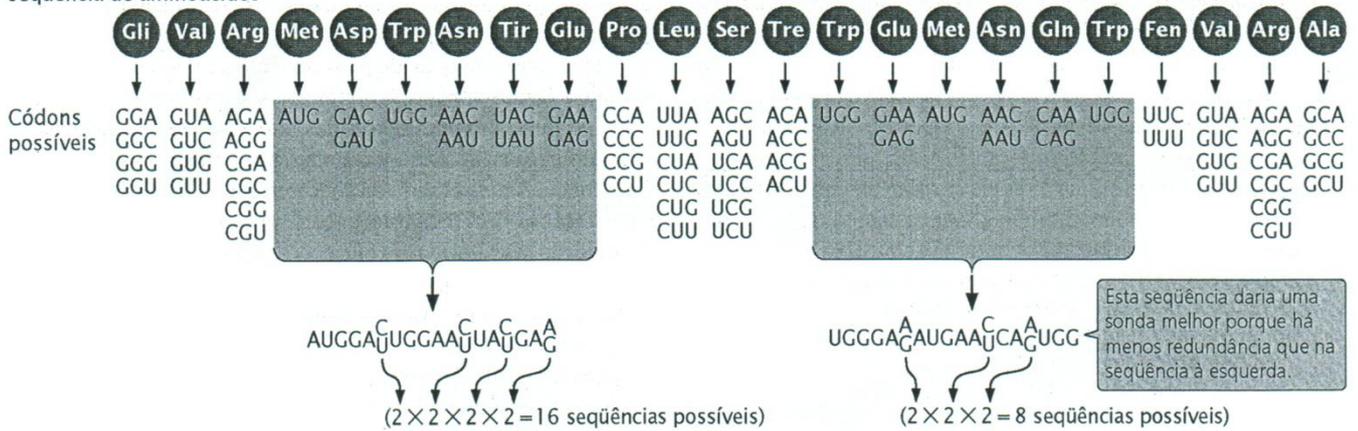


Fig. 18.16 Uma sonda sintética pode ser criada com base no código genético e na seqüência de aminoácidos conhecida da proteína codificada pelo gene de interesse. Devido à ambigüidade do código, a mesma proteína pode ser codificada por várias seqüências diferentes de DNA, e as sondas que consistem em todas as seqüências possíveis devem ser sintetizadas. Para minimizar o número de seqüências que devem ser sintetizadas, é colhida uma região do gene com o mínimo de redundância.

contêm o gene de interesse. Vários métodos de triagem podem ser necessários para se determinar que clones de fato contêm o gene.

Conceitos

Uma biblioteca de DNA pode ser triada quanto a um gene específico usando sondas complementares que hibridizam com o gene. Alternativamente, a biblioteca pode ser clonada em um vetor de expressão, e o gene pode ser localizado examinando os clones quanto ao produto protéico do gene.

Métodos de Seqüenciamento de DNA

Os mapas físicos mais detalhados são baseados nas informações de **seqüenciamento de DNA**. Os primeiros métodos para seqüenciamento rápido de DNA foram desenvolvidos entre 1975 e 1977. Frederick Sanger e seus colaboradores criaram o método de seqüenciamento didesóxi baseado no alongamento do DNA. Allan Maxam e Walter Gilbert desenvolveram um segundo método baseado na degradação química do DNA. O método de Sanger rapidamente tornou-se o procedimento padrão para o seqüenciamento de qualquer fragmento purificado de DNA.

O método de Sanger, ou didesóxi, de seqüenciamento do DNA é baseado no processo de replicação. O fragmento a ser seqüenciado é usado como um molde para fazer uma série de novas moléculas de DNA. No processo, a replicação é, às vezes (mas nem sempre) finalizada quando uma base específica é encontrada, produzindo filamentos de DNA de tamanhos diferentes, cada um dos quais termina na mesma base.

O método é baseado no uso de um substrato especial para a síntese de DNA. Normalmente, o DNA é sintetizado a partir de trifosfatos de desoxirribonucleosídeos (dNTPs), que têm um grupo OH no átomo de carbono 3' (FIGURA 19.5a). Na síntese de DNA, dois grupos fosfato no átomo de carbono 5' de um dNTP são removidos, e é formada uma ligação fosfodiéster entre o grupo 5'-fosfato restante do dNTP e o grupo 3'-OH do último nucleotídeo na cadeia crescente de DNA (veja Cap. 12). No método de Sanger, um nucleotídeo especial, chamado **trifosfato de didesoxirribonucleosídeo** (ddNTP; FIGURA 19.5b), é usado como substrato. Os ddNTPs são idênticos aos dNTPs, exceto pela falta de um grupo 3'-OH. Como os dNTPs, os ddNTPs possuem três grupos fosfato em suas pontas 5', e assim eles são incorporados em uma cadeia crescente de DNA. Quando um ddNTP é incorporado a uma cadeia de DNA, nenhum outro nucleotídeo pode ser adicionado, pois não há grupo 3'-OH para formar uma ligação fosfodiéster com um nucleotídeo que chega. Assim, os ddNTPs finalizam a síntese de DNA.

Uma única molécula de DNA não pode ser seqüenciada, logo qualquer fragmento de DNA a ser seqüenciado deve primeiro ser amplificado pela PCR ou por clonagem em bactérias. As cópias do DNA alvo são isoladas e divididas em quatro partes (FIGURA 19.6). Cada parte é colocada em um tubo diferente, ao qual são adicionados:

1. muitas cópias de um *primer* que é complementar a uma ponta do filamento do DNA alvo;
2. todos os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeos (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), os precursores normais da síntese de DNA;
3. uma pequena quantidade de *um* dos quatro tipos de trifosfatos de didesoxirribonucleosídeos (ddCTP, ddATP, ddGTP ou ddTTP), que irão finalizar a síntese de DNA tão logo seja

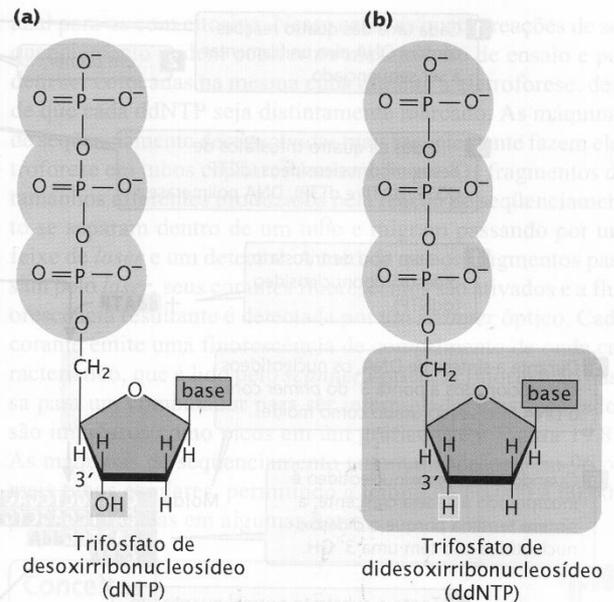


Fig. 19.5 A reação de seqüenciamento didesóxi requer um substrato especial para a síntese de DNA. (a) Estrutura do trifosfato de desoxirribonucleosídeo, o substrato normal para a síntese de DNA. (b) Estrutura do trifosfato de didesoxirribonucleosídeo, que não tem um grupo OH no átomo de carbono 3'.

DNA nos tubos é desnaturado, e os produtos unifilamentares de cada reação são separados por eletroforese em gel.

Os conteúdos dos quatro tubos são separados lado a lado em um gel de acrilamida, de modo que os filamentos de DNA que diferem em tamanho por apenas um nucleotídeo podem ser diferenciados. Após a eletroforese, os locais dos filamentos de DNA no gel são revelados por auto-radiografia. Os filamentos mais curtos, que terminam em posições bem iniciais na seqüência de DNA, migram rapidamente e terminam perto da parte mais baixa do gel; os filamentos mais longos, que terminam mais tarde na seqüência, migram mais lentamente e terminam perto do topo do gel.

A leitura da seqüência do DNA é simples e é a parte mais curta do procedimento. Na Fig. 19.6, você pode ver que a banda mais próxima da parte inferior do gel é do tubo que contém a reação de ddGTP, o que significa que o primeiro nucleotídeo sintetizado tinha guanina (G). A banda superior seguinte é do tubo que continha ddATP; logo, o nucleotídeo seguinte na seqüência é adenina (A), e assim por diante. Desse modo, a seqüência é lida de baixo para cima no gel, com os nucleotídeos perto da parte inferior correspondendo à ponta 5' do filamento de DNA recém-sintetizado, e os perto de cima correspondendo à ponta 3'. Tenha em mente que a seqüência obtida não é a do DNA alvo, mas a de seu *complemento*.

Você pode indagar como foram construídos os *primers* usados no seqüenciamento didesóxi, pois a seqüência do DNA alvo pode não ser conhecida antecipadamente. O truque é inserir uma seqüência que será reconhecida pelo *primer* no DNA alvo. Isso em geral é feito primeiro clonando o DNA alvo em um vetor que contenha seqüências reconhecidas por um *primer* comum (chamado sítios universais de seqüenciamento de *primer*) em ambos os lados do sítio onde o DNA alvo será inserido. O DNA alvo é então isolado do vetor e irá conter sítios universais de seqüenciamento de *primer* em cada ponta (FIGURA 19.7).

O seqüenciamento em geral é feito por máquinas automatizadas que usam corantes fluorescentes e *scanners* a *laser* para seqüenciar milhares de pares de bases em algumas horas (FIGURA 19.8). A reação didesóxi também é usada aqui, mas os ddNTPs usados na reação são marcados com um corante fluorescente, e um corante diferente é usado para tipo de didesoxinucleotídeo. Por exemplo, um corante vermelho pode ser usado para nucleotídeos com timina, um corante verde para os com adenina, um corante preto para os com guanina e um corante

azul para os com citosina. Nesse caso, as quatro reações de seqüenciamento podem ocorrer no mesmo tubo de ensaio e podem ser colocadas na mesma cuba durante a eletroforese, desde que cada ddNTP seja distintamente marcado. As máquinas de seqüenciamento desenvolvidas mais recentemente fazem eletroforese em tubos capilares contendo o gel. Os fragmentos de tamanhos diferentes produzidos pela reação de seqüenciamento se separam dentro de um tubo e migram passando por um feixe de *laser* e um detector. À medida que os fragmentos passam pelo *laser*, seus corantes fluorescentes são ativados e a fluorescência resultante é detectada por um *scanner* óptico. Cada corante emite uma fluorescência de comprimento de onda característico, que é lido pelo *scanner* óptico. A informação passa para um computador para ser interpretada, e os resultados são impressos como picos em um gráfico (veja Figura 19.8). As máquinas de seqüenciamento automatizado contêm 96 ou mais tubos capilares, permitindo a leitura de 50.000 a 60.000 pb de seqüências em algumas horas.

Conceitos

O DNA pode ser rapidamente seqüenciado pelo método didesóxi, no qual os ddNTPs são usados para finalizar a síntese de DNA em bases específicas. Os métodos de seqüenciamento automatizado permitem a leitura de milhares de pares de bases em apenas algumas horas.

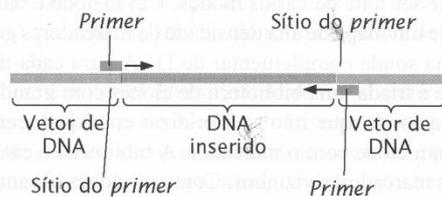


Fig. 19.7 Sítios reconhecidos pelos *primers* de seqüenciamento são adicionados ao DNA alvo clonando o DNA em um vetor que contém sítios universais de *primers* de seqüenciamento em ambos os lados do sítio onde o DNA alvo será inserido.

- 1 Um fragmento de DNA unifilar cuja seqüência de bases se quer determinar (o molde) é isolado.
- 2 Cada um dos quatro ddNTPs é marcado com um corante fluorescente, e é feita a reação de seqüenciamento de Sanger.
- 3 Os fragmentos que terminam na mesma base têm o mesmo corante ligado.
- 4 Os produtos são desnaturados, e os fragmentos produzidos de DNA pelas quatro reações são misturados e colocados em uma única cuba no gel de eletroforese. Os fragmentos migram pelo gel de acordo com o tamanho,...
- 5 ... e o corante fluorescente no DNA é detectado usando um feixe de *laser* e um detector.
- 6 Cada fragmento aparece como um pico na impressão de computador; a cor do pico indica que base é representada por ele.
- 7 A seqüência da informação é lida diretamente no computador, que a converte na seqüência—alvo—complementar.

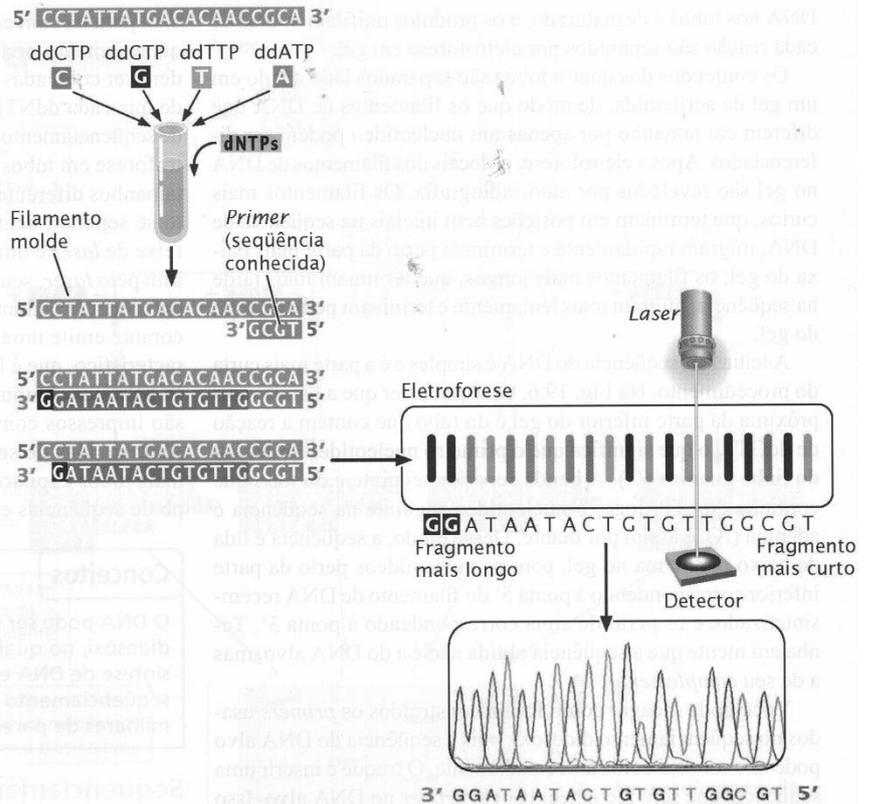
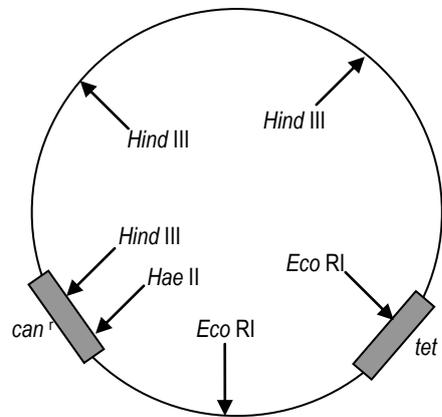


Fig. 19.8 O método de seqüenciamento didesóxi pode ser automatizado.

EXERCÍCIOS

1. Um gene do milho chamado *gln2*, que sintetiza a forma cloroplástica da enzima glutamina-sintetase, contém um único sítio de clivagem para a enzima *Hind III* em sua sequência, mas nenhum sítio de clivagem para a *Eco RI*. Você tem nas mãos um vetor de clonagem, que é um plasmídeo de *E. coli* que contém um único sítio de clivagem *Hind III* dentro do gene *amp* que confere resistência ao antibiótico ampicilina à célula hospedeira e um único sítio de clivagem *Eco RI* num outro gene do plasmídeo, o gene *tet*, que determina resistência à tetraciclina. Você também tem no laboratório uma linhagem de *E. coli* que é sensível aos antibióticos ampicilina e tetraciclina. Além disso, há o gene *gln2* de outra gramínea disponível. Como você construiria uma biblioteca de DNA genômico do milho que possa incluir uma cópia inteira do gene *gln2*? E como encontrar esse gene na biblioteca?

2. O gene para alfa-tubulina de *Neurospora* foi clonado em vetor lambda e está disponível. Enumere as etapas do processo de clonagem e isolamento do mesmo gene do fungo similar *Podospora*, usando como vetor de clonagem o plasmídeo representado abaixo, no qual os genes para resistência aos antibióticos canamicina (*can^r*) e tetraciclina (*tet^r*) estão representados.



3. Você deseja estudar o gene que codifica uma proteína e tem à sua disposição:

- ✓ anticorpo contra a proteína
- ✓ uma linhagem celular que expressa a proteína em níveis altos
- ✓ uma linhagem celular que não expressa a proteína
- ✓ biblioteca genômica das duas linhagens celulares
- ✓ biblioteca de cDNA das duas linhagens celulares
- ✓ biblioteca de expressão (cDNA) das duas linhagens celulares

Descreva uma estratégia que você poderia utilizar para conseguir um clone genômico que contenha o gene que codifica essa proteína.

APÊNDICE I

TÉCNICAS DE CULTURA BACTERIANA

Trabalhar com bactérias e vírus é muito diferente do que com drosófilas ou mesmo com fungos: o geneticista não mais trabalha com indivíduos, mas com grandes populações onde detecta com facilidade eventos genéticos raros, os quais são quase impossíveis de serem detectados quando se trabalha com eucariontes. Uma única gota de suspensão bacteriana pode conter um bilhão de bactérias (10^9), e a mesma quantidade de vírus pode ser apanhada na ponta de uma agulha. Esses microorganismos apresentam grandes vantagens para o estudo genético por ocuparem um pequeno volume e por requererem condições simples de crescimento, permitindo assim sua utilização em experimentos de seleção de mutantes, ou de recombinantes de uma progênie.

A fim de que possamos entender como os métodos de seleção são aplicados, consideramos as técnicas básicas de cultura e de manipulação de populações bacterianas. Um dos organismos mais frequentemente utilizados é a bactéria do intestino *Escherichia coli*, e portanto ela será utilizada como exemplo. A bactéria *E. coli* do tipo selvagem cresce quando provida dos elementos carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, sódio e magnésio, que são convertidos em aminoácidos, proteínas, lipídeos, polissacarídeos, etc. Estes elementos são básicos para a estrutura e o metabolismo da bactéria, e são geralmente fornecidos como sais inorgânicos, como NaCl e $MgCl_2$. Um açúcar, comumente a glicose, é utilizado como fonte de carbono numa solução aquosa com pH corrigido para próximo da neutralidade. O meio deve conter também a vitamina biotina e o nucleosídeo timidina. A introdução de algumas bactérias em tal meio, denominado **meio mínimo**, resultará em aproximadamente 10^9 (1.000.000.000) bactérias por ml após somente 24 horas de incubação a $37^\circ C$.

Por outro lado, bactérias podem crescer num meio nutritivo rico, contendo por exemplo extrato de carne, extrato de levedura ou hidrolisado de proteínas do leite que fornecerão muitas das substâncias intermediárias de metabolismo, as quais poderão ser usadas diretamente, sem necessidade de sintetizá-las a partir dos elementos básicos. O crescimento nesses meios ricos tende a ser mais rápido, mas o número final de organismos é aproximadamente o mesmo. Ambos os meios, mínimo ou nutritivo, podem ser solidificados pela adição de agar, e então distribuídos em placas de Petri. Uma suspensão bacteriana pode ser espalhada na superfície do agar. Cada bactéria dessa superfície dará origem a um colônia contendo cerca de 10^7 indivíduos, todos exatamente iguais à bactéria original - um **clone**.

O número de bactérias em uma cultura pode ser determinado fazendo-se diluições seriadas dessa cultura. Uma diluição de 10 vezes é feita diluindo-se 1 ml da cultura em 9 ml de meio esterilizado. Amostras de diferentes diluições são espalhadas em placas contendo meio nutritivo e incubadas por 12-18 horas. A contagem das colônias somente é possível nas placas em que as mesmas estão suficientemente espaçadas, ou seja, nas placas onde a diluição foi adequada. O número de colônias de

cada placa é multiplicado pelo fator de diluição utilizado, para se ter uma estimativa do número de bactérias na cultura original, não diluída.

Nas placas onde foi espalhado um grande número de bactérias, colônias individuais são indistinguíveis, pois tornam-se unidas por crescimento confluyente. Esse crescimento uniforme sobre toda a superfície da placa é chamado **camada bacteriana**.

Este apêndice contém duas partes com técnicas de cultura bacteriana. A Parte I, "Crescimento de Culturas em Meio Líquido", fornece um protocolo para crescer culturas em meio líquido de *E. coli*. As culturas crescidas durante 12 horas podem ser utilizadas para a purificação de DNA de plasmídeo e para a inoculação de outras culturas. É conveniente fazer o crescimento de uma cultura de *E. coli* portadora de um plasmídeo em meio de cultura que contenha o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência. Assim, linhagens contendo o gene de resistência à ampicilina devem ser crescidas em meio LB (de Luria Bertani, seus criadores) contendo ampicilina na concentração adequada. Células que eventualmente perderem o plasmídeo de resistência morrem neste meio, não prejudicando o rendimento do experimento.

A Parte II, "Cultura de Bactérias em Meio Sólido", apresenta dois procedimentos básicos para a obtenção de colônias individualizadas. Em um desses métodos, a cultura de bactérias é inoculada em meio sólido com o auxílio de uma alça inoculadora de platina, método denominado **estriamento**. Este método é utilizado quando se deseja obter um clone individualizado a partir de um caldo de cultura, geralmente uma suspensão de células que estava armazenada ou a partir de uma outra colônia. No método alternativo, as células de uma cultura podem ser espalhadas com o auxílio de uma alça de vidro ou alça de Drigalski. Esse método pode ser chamado de **plaqueamento**. Esse procedimento pode ser utilizado para calcular o número de células viáveis presentes em uma amostra de bactérias. O plaqueamento também é empregado para selecionar clones após o procedimento de transformação bacteriana (você viu detalhes na unidade sobre transformação).

O emprego de células derivadas de um única colônia minimiza o risco de se usar num experimento uma massa de células que foi contaminada por outros tipos de microorganismos. Para se estudar a resistência bacteriana aos antibióticos, será observado o crescimento de uma cultura de *E. coli* selvagem e de uma linhagem de *E. coli* portadora de um gene que confere resistência à ampicilina, utilizando-se o meio LB acrescido de ampicilina. A linhagem resistente é portadora de um plasmídeo responsável pela produção de uma enzima que destrói a ampicilina presente no meio, permitindo assim o seu crescimento.

O meio de cultura para *E. coli* é também ideal para o crescimento de muitos outros tipos de microorganismos. Por isso, é fundamental a manutenção de um ambiente estéril para minimizar a chance de contamina-

ção da cultura de um experimento com fungos ou bactérias indesejáveis. Condições de assepsia devem ser mantidas para que uma cultura de bactérias possa ser utilizada em experimentos subsequentes. Por isso, tudo

que tem contato com uma cultura de bactérias deve ser esterilizado: meio de cultura, soluções, pipetas, alças de inoculação e espalhadores de células (alça de Drigalski), frascos, tubos de cultura e placas de Petri.

NOTAS INTRODUTÓRIAS

AMPICILINA: Apesar da sua estabilidade, a ampicilina, como muitos dos antibióticos, é inativada por aquecimento prolongado. Portanto, é importante resfriar a solução do agar recém-derretido até cerca de 60°C antes de adicionar o antibiótico.

FLAMBAGEM: A flambagem mata os microorganismos que se acumulam nas bordas dos tubos. O processo também aquece o ar na boca do recipiente criando uma corrente de convecção que diminui a chance de um microorganismo cair dentro do recipiente. O importante é lembrar que flambam-se SOMENTE OBJETOS DE VIDRO no laboratório. Jamais devem ser flambados objetos de plástico, como por exemplo, as ponteiros dos micropipetadores.

MANUSEIO E DESCARTE DE BACTÉRIAS: *E. coli* é um organismo comensal do homem e parte da flora bacteriana normal que habita o nosso intestino. Ela não é considerada patogênica e muito raramente está associada a doenças em indivíduos saudáveis. Além disso, a maior parte das linhagens utilizadas em laboratório são muito pouco eficientes em colonizar o intestino humano. Se regras simples de manuseio e descarte forem obedecidas, trabalhar com *E. coli* não oferece risco.

1. Para evitar contaminação, sempre re flame a alça de inoculação ou esterilize o espalhador (alça de Drigalski) com álcool antes de recolocá-los sobre a bancada.

2. Mantenha a boca e o nariz longe das ponteiros e das extremidades das pipetas quando for pipetar uma suspensão de bactérias, para evitar inalar bactérias caso se formem aerossóis.
3. Não incube placas além do tempo necessário. Geralmente *E. coli* é o único microorganismo que cresce após 12-24 horas de incubação. Porém, com incubações mais longas, bactérias contaminantes e fungos de crescimento mais lento podem começar a crescer. Se as placas não puderem ser analisadas logo após a primeira incubação, guarde-as na geladeira para retardar o crescimento bacteriano.
4. Colete todos os tubos, ponteiros, pipetas utilizados em contato com bactérias logo após o seu uso. Estes materiais devem ser desinfetados. Outros organismos contaminantes de odor desagradável podem vir a crescer se o material for armazenado à temperatura ambiente sem desinfecção adequada. Para proceder à desinfecção do material, proceda da seguinte maneira: trate todo o material contaminado mergulhando-o em uma solução de água sanitária (2%) ou Lysoform a 20%. Faça a submersão das ponteiros em um recipiente contendo a solução desinfetante. Deixe o material de molho pelo menos 15 minutos. As pipetas de vidro, os tubos de ensaio e Erlenmeyers contendo restos de cultura devem ser reunidos em local apropriado, para posterior autoclavagem.
5. Limpe a bancada com um desinfetante como o Lysoform ao fim da prática laboratorial.
6. Lave suas mãos antes de deixar o laboratório.

PARTE I. CRESCIMENTO DE CULTURAS EM MEIO LÍQUIDO

Embora seja melhor crescer uma cultura em meio líquido durante uma noite (no mínimo 12 horas) com agitação para melhorar a aeração, é possível crescer células para preparação de DNA de plasmídeo ou para inocular outras culturas em uma estufa, sem agitação. Neste caso, a falta de aeração faz com que o crescimento seja mais lento, por isso, o tempo de incubação deve ser aumentado, talvez até para 2 ou três dias.

Quando se vai fazer crescimento de *E. coli* em grande escala, utiliza-se Erlenmeyers, porque oferecem uma grande superfície para a aeração da cultura. Quando se está cultivando uma linhagem portadora de plasmídeo de resistência a drogas, é melhor usar o antibiótico no crescimento da cultura para manter a seleção. Também é recomendável inocular mais de um frasco da mesma cultura, para o caso de uma delas vir a falhar.

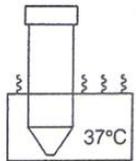
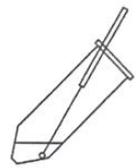
MATERIAL

- placa com cultura de *E. coli*
- meio de cultura líquido LB
- alça de inoculação
- solução de desinfetante
- bico de Bunsen
- caneta marcadora
- banho-maria com agitação, agitador ou estufa a 37°C

PROCEDIMENTO

Atenção para manter a esterilidade durante os procedimentos experimentais. Uma alça de inoculação deve ser considerada contaminada toda vez que sua metade inferior tocar qualquer coisa no ambiente de trabalho, por exemplo, a bancada, uma estante ou suas mãos. Quando se suspeitar de contaminação, a alça deve ser novamente esterilizada. Planeje cada etapa de seu experimento, organize a bancada de trabalho e trabalhe rápido:

1. Identifique com a caneta o tubo contendo o meio estéril com a letra da turma e número do grupo.
2. Localize na placa de Petri uma colônia bem definida com 1-4 mm de diâmetro.
3. Esterilize a alça inoculadora no bico de Bunsen até ficar rubra. Então passe todo o arame da alça pela chama.
4. Esfrie a extremidade da alça encostando-a algumas vezes na superfície do agar. Não encostar na placa.
5. Use a alça para raspar a colônia escolhida de *E. coli*.
6. Transfira a colônia para o tubo de cultura, observando os passos a seguir: **a.** remova a tampa do tubo de cultura, segurando-a no dedo mínimo; **b.** flambe rapidamente a boca do tubo na chama; **c.** submerja a ponta da alça no meio de cultura LB e agite para que a massa de células se solte da alça; **d.** reflambe rapidamente a boca do tubo e recoloque a tampa.
7. Reflame a alça antes de recolocá-la na bancada.
8. Coloque a tampa no frasco de cultura um pouco frouxa para permitir o fluxo de ar dentro da cultura.
9. Incube a cultura por 12 a 24 horas a 37°C, de preferência com agitação contínua.
10. Organize e limpe seu local de trabalho: descarte adequadamente o material que teve contato com as culturas de bactérias.



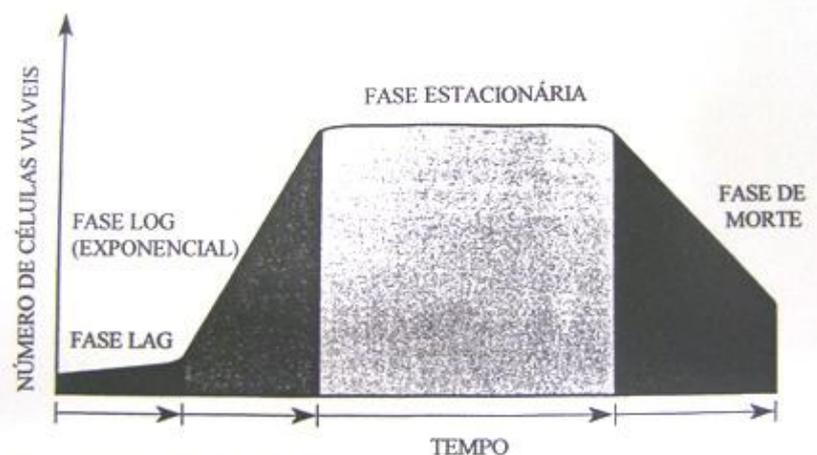
Culturas para obtenção de plasmídeos podem ser incubadas a 37°C, sem agitação por dois dias ou mais. Após a incubação inicial, a cultura pode ser armazenada à 4°C por vários dias, até que você a use.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma cultura de bactérias em meio líquido passa por uma série de etapas no seu crescimento. Por aproximadamente 30 minutos após a sua inoculação, existe a chamada fase **lag**, durante a qual praticamente não há multiplicação de bactérias. Então, as bactérias começam a se dividir rapidamente na chamada fase **log**, em que dobra o número de células a cada 20-25 minutos. À medida que os nutrientes do meio vão se esgotando, a velocidade de divisão diminui progressivamente até praticamente parar. Esta é a fase **estacionária**, em que a concentração bacteriana é de cerca de 10^9 células/ml. A partir deste ponto, o aumento de produtos de excreção começa a matar as células; é a fase de **morte celular**.

O crescimento ótimo de uma cultura em suspensão é geralmente atingido se houver aeração do meio de cultura, ou seja, agitação contínua. A agitação facilita a aeração, a troca de nutrientes com o meio e também dispersa os produtos prejudiciais do metabolismo. Na presença de agitação contínua, uma cultura atinge a fase estacionária após uma noite de incubação.

Uma cultura na fase estacionária tem aparência turva. Culturas que não têm aparência turva devem ser descartadas, por não houve crescimento adequado. Sem agitação, deve ocorrer crescimento muito menor após as primeiras 12 horas de incubação. Para avaliar o crescimento bacteriano, agite o meio para ressuspender as células que estão no fundo do tubo.



Curva de crescimento de *E. coli*

PERGUNTAS PARA DISCUSSÃO

1. Quando é necessário empregar as técnicas assépticas?
2. Para que serve a flambagem de bocas dos tubos?
3. Por que 37°C é a temperatura ótima de crescimento de *E. coli* ?
4. Por que o ideal é crescer uma cultura em suspensão com agitação contínua? Dê duas explicações.
5. Como você acha que a curva de crescimento da página anterior foi construída?
6. Quantas células aproximadamente devem existir em 5 ml de uma cultura na fase estacionária?

PARTE II. CULTURA DE BACTÉRIAS EM MEIO SÓLIDO

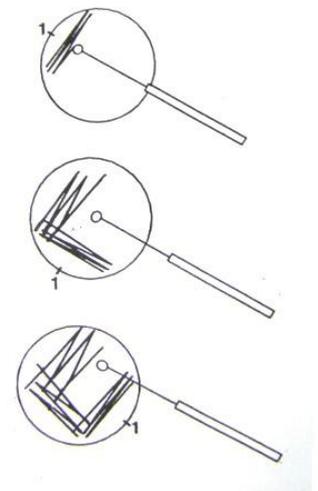
MATERIAL

- cultura de bactéria *E. coli* selvagem em meio líquido
- alça de inoculação
- cultura de bactéria *E. coli* selvagem diluída $1,5 \times 10^6$
- bico de Bunsen
- placas de agar LB (LB)
- caneta marcadora
- alça de Drigalski
- solução de desinfetante
- pipeta de vidro estéril (1 ou 2 ml)
- estufa a 37°C

PROCEDIMENTO A: ESTRIANDO BACTÉRIAS EM PLACAS

1. Use a caneta marcadora para marcar o *fundo* da placa de Petri contendo meio LB, com a letra da turma e número do grupo. Habitue-se a identificar sempre as placas de Petri pelo fundo, assim, o agar ficará sempre junto com a parte da placa identificada. Ocupe uma área pequena da placa com a identificação.
2. Segure a alça de inoculação como se fosse um lápis e esterilize a extremidade da alça na chama até ficar rubra. Então passe rapidamente todo o arame através da chama.
3. Espere a alça esfriar por 5 segundos. Para evitar contaminação, não recoloque a alça na bancada.
4. Agora você vai prosseguir com o plaqueamento, da seguinte maneira:
 - a. Segure o fundo do tubo que contém a cultura de bactérias (não diluída) entre o polegar e dois dedos livres. Remova a tampa do tubo utilizando o dedo mínimo da mesma mão que segura a alça. Evite tocar as bordas da tampa.
 - b. Passe rapidamente a boca do tubo várias vezes sobre o bico de Bunsen e flambe a alça.
 - c. Encoste a alça no agar algumas vezes até esfriá-la.
 - d. Mergulhe a alça na cultura várias vezes para coletar material. Remova a alça, flambe a boca do frasco e feche-o. Prossiga com o passo 5.
5. Levante a tampa de uma placa LB o suficiente para permitir a inoculação, como está demonstrado na figura. Não coloque a tampa sobre a bancada.
 - a. Passo 1: Deslize a ponta da alça inoculadora sobre a superfície do agar para fazer uma série de estrias na parte superior da placa. Evite rasgar o agar. Recoloque a tampa até a próxima etapa.
 - b. Passo 2: Reflambe a alça inoculadora e esfrie-a encostando na superfície do agar. Gire a placa inoculada na etapa 1 como indicado na figura e passe a ponta da alça uma vez sobre a primeira série de estrias e, sem levantar a alça, faça uma linha em zigue-zague ocupando cerca de um quarto da superfície do agar. Recoloque a tampa da placa até a próxima etapa.
 - c. Passo 3: Reflambe a alça inoculadora e esfrie-a no agar. Reposicione a placa conforme a figura e passe a ponta da alça uma vez sobre as últimas linhas riscadas na segunda etapa e faça um outro risco em zigue-zague em um quadrante adjacente da placa, sem tocar nas linhas feitas previamente.
6. Coloque a placa na posição invertida (com a tampa para baixo) em uma estufa a 37°C e mantenha-as de 12 a 24 horas.
7. Faça a limpeza da bancada e organize-se para o descarte correto de todo o material empregado: mantenha os restos das culturas na bancada para descarte futuro.

Planeje seu experimento antes de começar. Organize a bancada para permitir maior espaço de trabalho e trabalhe rápido. Se você estiver trabalhando com cultura em meio líquido, afrouxe a tampa antes de começar.

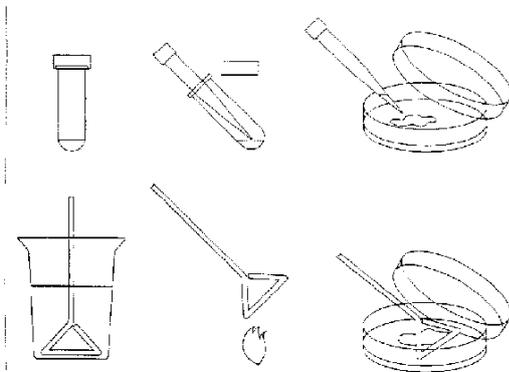


PROCEDIMENTO B: PLAQUEANDO BACTÉRIAS COM ALÇA DE VIDRO

1. Use uma P200 para adicionar 100 μ l da cultura diluída na placa LB.
2. Esterilize a alça de Drigalski e plaqueie as bactérias na superfície de cada placa, em série, de acordo com as instruções abaixo:
 - a. Mergulhe o espalhador em álcool, e passe-o rapidamente na chama para inflamar o álcool. Deixe o álcool queimar *fora da chama*.

CUIDADO! Tenha muito cuidado para não aproximar a chama do álcool.

- b. Levante a tampa da placa, como uma concha, apenas o suficiente para permitir o plaqueamento.
 - c. Resfrie o espalhador encostando-o na parte interna da tampa da placa ou na superfície do agar, longe das células.
 - d. Toque o espalhador na suspensão de células, e deslize-o levemente, em vai-e-vem, na superfície do agar. Gire a placa em um quarto de volta, e repita os movimentos.
 - e. Recoloque a tampa na placa. Devolva o espalhador para o etanol *sem flambar*.
3. Deixe a placa em repouso por vários minutos, para que as suspensões de células sejam absorvidas.
4. Coloque a placa invertida em uma estufa a 37°C, e incube por 12-24 h.
5. Após a incubação, conserve a placa a 4°C para interromper o crescimento da *E. coli*, e retardar o crescimento de microorganismos contaminantes.
6. Aproveite o tempo para uma limpeza apropriada:
 - a. Separe para posterior autoclavagem, tubos e placas de cultura que tenham entrado em contato com a *E. coli*.
 - b. Limpe a bancada do laboratório com uma solução de água sanitária a 10%, ou desinfetante.
 - c. Lave as mãos antes de deixar o laboratório.



Não permita que as células fiquem muito tempo depositadas antes de espalhá-las, pois elas ficarão adsorvidas em pontos concentrados. O objetivo é distribuí-las homogeneamente sobre a superfície da placa para permitir que cada célula dê origem a uma colônia isolada.

A alça, submersa em álcool, já está estéril. O único propósito de usar a chama é o de queimar o álcool excedente antes de espalhar as células. O vidro irá superaquecer se for deixado diretamente sobre a chama do bico de Bunsen por vários segundos e irá, em consequência, matar as células de *E. coli*.

PERGUNTAS PARA DISCUSSÃO

1. Por que as placas de cultura foram incubadas a 37°C e em seguida armazenadas na geladeira em posição invertida?
2. Os resultados foram exatamente os esperados? Sugira explicações para as possíveis causas da variação em relação ao esperado.
3. Com relação ao passo número 5: **a.** Por que as estrias são feitas em padrão de zigue-zague?; **b.** Por que a alça é re-esterilizada entre cada uma das estrias?
4. Descreva a aparência de um única colônia de *E. coli*. Por que ela pode ser considerada como geneticamente homogênea?
5. Os laboratórios geralmente usam culturas de *E. coli* derivada de uma ou de algumas colônias, sempre isoladas através do método das estrias. Por que é importante utilizar este tipo de colônia em experimentos genéticos?

APÊNDICE II

MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES

O sucesso dos experimentos do nosso curso depende do uso de reagentes e soluções não contaminadas, portanto preste bastante atenção às condições de limpeza. As receitas estão organizadas em seções. As soluções que são usadas em mais de uma aula estão listadas apenas uma vez de acordo com o primeiro uso.

I. Extração de DNA

a. Minipreparação de plasmídeos

Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) 0,5 M (pH 8,0)

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione 18,6 g de EDTA a 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o pH para 8,0 adicionando lentamente hidróxido de sódio. Monitore com o auxílio de um medidor de pH.
3. Misture vigorosamente num agitador magnético ou com a mão. O EDTA só se dissolverá completamente quando o pH atingir 8,0 ou mais.

Glicose/Tris/EDTA (GTE)

Prepare 100 ml e mantenha a 4°C ou a temperatura ambiente por tempo indefinido.

- 0,9 g de glicose (50 mM)
- 2,5 ml de Tris 1 M (pH 8,0) (25 mM)
- 2 ml de EDTA 0,5 M (10 mM)
- 94,5 ml de água deionizada

Acetato de potássio (KOAc) 5 M

Prepare 200 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione 98,1 g de acetato de potássio a 160 ml de água deionizada.
2. Complete o volume para 200 ml com água.

Acetato de potássio/Ácido acético

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente ou a 4°C por tempo indefinido.

Adicione 60 ml de acetato de potássio 5 M e 11,5 ml de ácido acético a 28,5 ml de água destilada ou deionizada. Misture bem.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Dissolva 10 g de SDS em 80 ml de água deionizada.
2. Complete o volume para 100 ml com água.

ATENÇÃO: Evite inalar o SDS em pó, use máscara quando o estiver pesando.

Hidróxido de sódio (NaOH) 4 N

Prepare 100 ml e armazene à temperatura ambiente.

1. Adicione vagarosamente 16 g de NaOH em 80 ml de água destilada e mexa continuamente. A solução ficará quente.

2. Quando o NaOH estiver completamente dissolvido, adicione mais água até completar 100 ml.

SDS 1%/NaOH 0,2 N

Prepare 10 ml e mantenha à temperatura ambiente. A solução se mantém estável por vários dias.

Misture 1 ml de SDS 10% e 0,5 ml de NaOH 4N em 8,5 ml de água destilada.

b. Extração de DNA total de *Drosophila*

Tampão de homogenização

Prepare 10 ml e mantenha à temperatura ambiente

- 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 7,8 (10 mM)
- 100 µl de EDTA 0,5 M (5 mM)
- 600 µl de NaCl 5 M (0,3 M)

Complete o volume para 10 ml com água destilada ou deionizada.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 20%

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Dissolva 20 g de SDS em 80 ml de água deionizada.
2. Complete o volume para 100 ml com água.

Clorofórmio/Álcool isoamílico (24:1)

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente.

Misture o clorofórmio e o álcool isoamílico na proporção de 24 volumes para 1 volume, isto é, para preparar 100 ml use 96 ml de clorofórmio e 4 ml de álcool isoamílico.

Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1)

Prepare 100 ml e mantenha a 4°C por 1 mês.

Adicione 50 ml de fenol equilibrado (previamente tratado com Tris-HCl pH 7,6) a 50 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

Tampão Tris/EDTA

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

- 1 ml de Tris 1 M (pH 8,0) (10 mM)
- 200 µl de EDTA 0,5 M (1 mM)
- 99 ml de água deionizada

Misture bem os ingredientes.

II. Eletroforese

Tampão de eletroforese Tris/Borato/EDTA (TBE) 10x

Prepare 1 litro e mantenha à temperatura ambiente.

- 108 g de Tris Base
 - 55 g de ácido bórico
 - 40 ml de EDTA (ethylene tetraacetic acid) 0,5M
1. Misture os ingredientes a 700 ml de água destilada ou deionizada em um frasco de 2 litros.
 2. Mexa até dissolver completamente, de preferência usando um agitador magnético.
 3. Complete o volume para um litro adicionando água destilada ou deionizada.

Tampão de eletroforese TBE 1x

Prepare 10 litros e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

Dilua 1 litro de TBE 10x em 9 litros de água destilada ou deionizada. Misture bem.

Agarose 0,8%, 1,0%, 1,5% e 2,0%

Prepare 200 ml. Use a solução recém preparada ou mantenha-a gelificada por várias semanas à temperatura ambiente.

1. Adicione 1,6 g (0,8%), 2,0 g (1,0%), 3,0 g (1,5%) ou 4,0 g (2%) de agarose a 200 ml de tampão TBE 1X em um Erlenmeyer de 600 ml.
2. Mexa até suspender a agarose.
3. A agarose é preparada em forno de microondas, para isso coloque o frasco descoberto no forno por aproximadamente 3-5 minutos.
4. Certifique-se de que a agarose dissolveu completamente. Se partículas translúcidas estiverem presentes, aqueça novamente a solução.

Tampão de aplicação de eletroforese

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

0,25 g de azul de bromofenol
0,25 g de xileno cianol
50 g de sacarose ou 50 ml de glicerol
1 ml de Tris 1 M (pH 8,0)

Se estiver usando sacarose:

1. Dissolva o azul de bromofenol, xileno cianol, sacarose e Tris em 60 ml de água destilada ou deionizada.
2. Complete o volume para 100 ml com água destilada ou deionizada.

Se estiver usando glicerol:

1. Dissolva o azul de bromofenol, xileno cianol e Tris em 49 ml de água destilada ou deionizada.
2. Acrescente 50 ml de glicerol e complete para 100 ml com água destilada ou deionizada.

Brometo de Etídeo 5 mg/ml - Solução Estoque

Prepare 50 ml e armazene em lugar escuro à temperatura ambiente ou a 4°C por tempo indefinido.

ATENÇÃO: O brometo de etídeo é mutagênico; quando estiver preparando a solução estoque use sempre luvas e máscara. Nunca manipule uma solução de brometo de etídeo sem proteger as mãos com luvas!

1. Dissolva 250 mg de brometo de etídeo em 50 ml de água deionizada ou destilada. De preferência use um frasco resistente, opaco e de tampa de rosca.

OBS: O descarte de soluções contendo brometo de etídeo requer certos cuidados, consulte protocolos específicos para esse procedimento.

III. Transformação Bacteriana

Cloreto de cálcio 1 M

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Dissolva 11,1 g de CaCl₂ anídrico ou 14,7 g de CaCl₂ hidratado em 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Complete o volume para 100 ml com água.

Cloreto de cálcio 50 mM

Prepare 1000 ml e mantenha à temperatura ambiente ou a 4°C por tempo indefinido.

1. Misture 50 ml de CaCl₂ 1 M com 950 ml de água deionizada.
2. Lave previamente um filtro estéril de 0,45 ou 0,22 micras com 50-100 ml de água destilada ou deionizada.
3. Filtre a solução de CaCl₂ no filtro pré-lavado.
4. Divida em alíquotas em tubos ou frascos estéreis.

IV. Cultura de Bactérias

Ampicilina 10 mg/ml

Prepare 100 ml e armazene a -20°C por um ano ou a 4°C por até 3 meses.

1. Prepare a solução em um frasco de 250 ml limpo. Adicione 1 g de ampicilina em 100 ml de água destilada ou deionizada. Mexa até dissolver completamente.
2. Lave previamente um filtro estéril de 0,45 ou 0,22 micras (Nalgene ou Corning) filtrando 50 - 100 ml de água destilada ou deionizada. Filtre então a solução de ampicilina.
3. Armazene em alíquotas de 10 ml em tubos estéreis e mantenha no freezer -20°C.

Meio nutritivo Luria-Bertani (LB)

Prepare um litro e armazene à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Pese: 10 g de bacto-triptona
5 g de extrato de levedura
10 g de NaCl
2. Coloque 1 litro de água destilada ou deionizada em um frasco limpo de 2 litros e adicione todos os ingredientes.
3. Adicione 0,5 ml de NaOH 4 M.
4. Mexa até dissolver completamente os ingredientes usando de preferência um agitador magnético.
5. Divida o meio de cultura em alíquotas de 250 ml (para uso no preparo de células competentes) ou de 100 ml (para uso em geral). Tampe os frascos com bolas de algodão ou espuma, cubra com papel alumínio e autoclave por 20 minutos a 121°C.

Meio LB + antibiótico

Prepare 100 ml e mantenha a 4°C por até 3 meses.

1. Adicione em condições estéreis 1 ml da solução de antibiótico 10 mg/ml ao meio nutritivo LB frio.
2. Mexa cuidadosamente.

Placas LB agar

Um litro de LB agar é suficiente para o preparo de 35 - 40 placas.

1. Pese: 10 g de bacto-triptona
5 g de extrato de levedura
10 g de NaCl
15 g de agar
2. Coloque 1 litro de água destilada ou deionizada em um frasco de 2 litros. Adicione os ingredientes acima e 0,5 ml de NaOH 4M.
3. Mexa até dissolver os ingredientes, usando de preferência um agitador magnético. Qualquer partícula sólida será dissolvida posteriormente durante a autoclavagem.
4. Cubra o frasco com papel alumínio e autoclave por 15 minutos a 121°C.
5. Durante a autoclavagem o agar muitas vezes não dissolve completamente, portanto agite o frasco até que não veja mais partículas sólidas de agar.
6. Deixe a solução esfriar até o ponto em que consiga segurar o frasco com a mão (55 - 60°C). Se esfriar demais e o agar começar a solidificar, aqueça novamente o meio em microondas ou autoclave por apenas 5 minutos.
7. Enquanto o meio de cultura está esfriando aproveite para marcar o fundo das placas de Petri com a data e o tipo de meio de cultura (por exemplo, LB, LB/amp etc).
8. Quando o meio esfriar, levante a tampa da placa de Petri o suficiente para derramá-lo. Não coloque a tampa sobre a bancada. Derrame o meio rapidamente até que cubra todo fundo da placa e forme uma camada de aproximadamente 3 mm. Cubra-a com a tampa.
9. Continue preparando as placas e ocasionalmente flambe a boca do frasco para mantê-lo estéril.
10. Se ocorrer a formação de bolhas sobre o meio derramado, passe rapidamente a chama do bico de Bunsen sobre a superfície do agar. Deixe as placas esfriarem sem movê-las.
11. Se possível incube as placas depois do meio ter solidificado viradas com a tampa para baixo numa estufa a 37°C por uma noite. Esse procedimento ajuda a secar o meio e diminuir a condensação quando as placas são mantidas na geladeira. Além disso, facilita a detecção de contaminação.

LB agar + antibiótico.

1. Siga as instruções acima para o preparo de placas LB até o passo 7.
2. Quando o meio estiver frio o suficiente para segurar o frasco, adicione 10 ml de antibiótico 10 mg/ml. Atenção, a ampicilina é destruída pelo calor, certifique-se de que o meio tenha esfriado antes de adicioná-la.
3. Mexa o frasco para misturar o antibiótico.
4. Prossiga como descrito acima a partir do passo 8.

V. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

NaCl 0,9%

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido (se esterilizada).

1. Pese 0,9 g de NaCl.
2. Coloque em um frasco limpo contendo 90 ml de água destilada.
3. Mexa até dissolver completamente, usando de preferência um agitador magnético.
4. Complete o volume para 100 ml com água destilada.

Tris 50 mM

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

Dissolva 0,6 g de Tris base em 100 ml de água deionizada ou destilada. O pH dessa solução será em torno de 10.

Chelex 10%

Prepare 10 ml e mantenha à temperatura ambiente por até 3 meses.

1. Pese 1 g de Chelex 100.
2. Adicione água destilada ao Chelex até atingir o volume de 10 ml.
3. Ajuste o pH para 11 usando NaOH concentrado.

Mistura de reação da PCR

Prepare 20 µl e mantenha no gelo

- 3 µl de tampão da enzima *Taq* polimerase (fabricante)
- 4,5 µl da mistura de dNTPs (abaixo)
- 1,5 µl de cada primer (4 µM cada)
- 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM)
- 0,25 µl de *Taq* polimerase
- 7,75 µl de água deionizada e estéril

Misture os ingredientes em um tubo de microcentrífuga (0,25 ml).

Mistura de desoxirribonucleotídeos (dNTPs)

Prepare 1 ml e mantenha a 20°C por até um ano.

- 125 µl de dATP 10 mM (1,25 mM)
- 125 µl de dCTP 10 mM (1,25 mM)
- 125 µl de dGTP 10 mM (1,25 mM)
- 125 µl de dTTP 10 mM (1,25 mM)
- 500 µl de água deionizada

Misture os ingredientes em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml).

VI. Southern blotting

Tampão de desnaturação

Prepare um litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione os seguintes ingredientes a 700 ml de água destilada ou deionizada em um frasco de 2 litros.

20 g de NaOH (0,5 M)
87,7 g de NaCl (1,5 M)

2. Mexa até dissolver, usando preferencialmente um agitador magnético.
3. Complete o volume para 1 litro com água destilada ou deionizada.

Tampão de neutralização

Prepare 1 litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione os seguintes ingredientes a 700 ml de água destilada ou deionizada em um frasco de 2 litros:

60,6 g de Tris (0,5 M)
87,7 g de NaCl (1,5 M)

2. Mexa até dissolver, usando preferencialmente um agitador magnético.
3. Ajuste o pH para 7,5 adicionando HCl concentrado.
4. Complete o volume para 1 litro com água destilada ou deionizada.

Tampão SSC 10x

Prepare 1 litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione os seguintes ingredientes a 700 ml de água destilada ou deionizada:

87,7 g de NaCl	(1,5 M)
44,1 g de citrato de sódio	(0,15 M)
2. Mexa até dissolver, usando preferencialmente um agitador magnético.
3. Ajuste o pH para 7,0 adicionando solução de NaOH.
4. Complete o volume para 1 litro com água destilada ou deionizada.

Tampão SSC 2x

Prepare um litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Dilua 200 ml de SSC 10x em 800 ml de água destilada ou deionizada.
2. Mexa até misturar bem.

SSC 2x + SDS 0,1%

Prepare um litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Misture 10 ml de SDS 10% com 990 ml de SSC 2x.
2. Mexa até misturar bem.

N-lauroylsarcosine 10%, sal de sódio

Prepare 100 ml e mantenha à temperatura ambiente.

1. Dissolva 10 g de N-lauroylsarcosine, sal de sódio em 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Complete o volume para 100 ml com água destilada ou deionizada.

Tampão de pré-hibridação

Prepare 100 ml e mantenha a -20°C por até um ano.

1. Misture os seguintes ingredientes em um frasco de 200 ml.

50 ml de SSC 10x (SSC 5x)
1 ml de N-lauroylsarcosine 10 (0,1%)
200 µl de SDS 10% (0,02%)
30 ml de água destilada.
2. Adicione 1 g de reagente bloqueador (fornecido junto com o kit).
3. Dissolva o reagente bloqueador mexendo continuamente, de preferência usando um agitador magnético e à 50-70°C. A solução deverá se tornar translúcida.
4. Complete o volume para 100 ml com água destilada ou deionizada.

Tampão de hibridação

Prepare 100 ml e mantenha a -20°C por até 6 meses.

Adicione a sonda marcada a 100 ml de tampão de pré-hibridação, desse modo a concentração da sonda é cerca de 10 ng/ml.

Tampão de lavagem 1

Prepare um litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Misture as seguintes soluções em um frasco de 2 litros:

100 ml de Tris 1 M pH 7,6	(100 mM)
30 ml de NaCl 5 M	(150 mM)
870 ml de água destilada ou deionizada	
2. Mexa até misturar bem.

Tampão de lavagem 2

Prepare um litro e mantenha a -20°C por até um ano.

1. Em um frasco de 2 litros adicione 10 g de reagente bloqueador (fornecido junto com o kit de marcação de sonda) a um litro de tampão de lavagem 1.
2. Dissolva o reagente bloqueador por agitação à temperatura de 50-70°C. A solução se tornará translúcida.

Tampão de lavagem 3

Prepare um litro e mantenha à temperatura ambiente por tempo indefinido.

1. Adicione 12,1 g de Tris a um frasco de 2 litros contendo 700 ml de água destilada ou deionizada.
2. Mexa até dissolver usando de preferência um agitador magnético.
3. Adicione 20 ml de NaCl 5 M.
4. Adicione 50 ml de MgCl₂ 1 M.
5. Ajuste o pH acrescentando vagarosamente HCl concentrado. Monitore com o auxílio de um medidor de pH.
6. Complete o volume para 1 litro acrescentando água.

Conjugado Anticorpo/Enzima

Prepare 100 ml e mantenha a 4°C por não mais do que 12 horas.

Adicione 10 µl do conjugado anticorpo/enzima (fornecido junto com o kit de marcação de sonda) a um frasco contendo 100 ml de tampão de lavagem 2 e misture.

Solução para a revelação colorimétrica

Prepare 10 ml. Use sempre solução nova a cada experimento.

Adicione 45 µl de "nitroblue tetrazolium salt" e 35 µl de solução "X-fosfato" (ambos produtos são fornecidos junto com o kit de marcação de sonda) a um frasco contendo 10 ml de tampão de lavagem 3.